

# POVEZANOST POLIMORFIZMA LOKUSA DRB GLAVNOGA SUSTAVA TKIVNE PODUDARNOSTI OBIČNE SRNE (*Capreolus capreolus*) S INVAZIJOM VELIKIM AMERIČKIM METILJEM (*Fascioloides magna*)

---

Svetličić, Ida

Doctoral thesis / Doktorski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:742455>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-12**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
BIOLOŠKI ODSJEK

Ida Svetličić

**POVEZANOST POLIMORFIZMA  
LOKUSA DRB GLAVNOGA SUSTAVA  
TKIVNE PODUDARNOSTI OBIČNE  
SRNE (*Capreolus  
capreolus*) S INVAZIJOM VELIKIM  
AMERIČKIM METILJEM (*Fascioloides  
magna*)**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2023.



University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE  
DEPARTMENT OF BIOLOGY

Ida Svetličić

**THE ASSOCIATION BETWEEN MAJOR  
HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX  
DRB LOCUS POLYMORPHISM IN ROE  
DEER (*Capreolus capreolus*) AND  
LARGE AMERICAN LIVER FLUKE  
(*Fascioloides magna*) INFECTION**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2023

“Ovaj doktorski rad izrađen je u Zavodu za animalnu fiziologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Ane Galov i izv. prof. dr. sc. Deana Konjevića, Dipl. ECZM, u sklopu sveučilišnog poslijediplomskog doktorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.“

## **INFORMACIJE O MENTORU: izv. prof. dr. sc. Ana Galov**

Ana Galov (rođ. Gomerčić) završila je studij molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu gdje je i doktorirala na temu genetičke raznolikosti populacije dobrog dupina u Jadranu. Od 1997. je zaposlena na Zavodu za animalnu fiziologiju Biološkog odsjeka PMF-a Sveučilišta u Zagrebu, gdje je 2009. izabrana na radno mjesto docentice, 2013. u znanstveno zvanje više znanstvene suradnice, 2017. na mjesto izvanredne profesorice, a 2019. je izabrana u znanstveno zvanje znanstvene savjetnice u području prirodnih znanosti, znanstveno polje biologija. Područja znanstvenog interesa su joj divlje i domaće životinjske vrste u Hrvatskoj poput vuka, čaglja, psa, divlje svinje, konja, dobrog dupina, običnog jelena, srne i crvenokljune čigre, te populacijsko-genetička istraživanja istih korištenjem neutralnih i adaptivnih genetičkih biljega. Usavršavala se na National Cancer Institute, National Institutes of Health, Frederick, SAD; Institute of Zoology, Zoological Society of London, Velika Britanija i Italian Institute for Environmental Protection and Research (ISPRA), Bologna, Italija, te na mnogim tečajevima i seminarima, uključujući i EMBL Course: Next Generation Sequencing: Amplicon Based Targeted Resequencing u Heidelbergu u Njemačkoj. Dobitnica je nekoliko stipendija i potpora za znanstveno usavršavanje i suradnju, poput stipendije European Molecular Biology Organization, stipendije Ministarstva vanjskih poslova Italije ili stipendije British Council Croatia, te je sudjelovala u provođenju mnogih projekata, uključujući nekoliko projekata Hrvatske zaklade za znanost te projekt financiran od Programa suradnje Interreg Slovenija-Hrvatska. Trenutno je suradnica na projektu Hrvatske zaklade za znanost „Kopno ili more: ekološki i genetički aspekti izbora staništa crvenokljune čigre“. Nositeljica je kolegija Osnove molekularne ekologije, Metode u imunologiji i Temelji animalne fiziologije. Do sada je vodila 23 diplomska i 8 doktorskih radova, te je vodila i dva znanstvena studentska rada nagrađena Rektorovom nagradom. Recenzirala je 25 radova za znanstvene časopise. Koautor je na 56 znanstvenih radova, od čega je njih 32 objavljeno u znanstvenim časopisima koji su rangirani u Q1 i Q2. Udana je i majka dvoje djece.

## **INFORMACIJE O MENTORU: izv. prof. dr. sc. Dean Konjević**

Dean Konjević studij veterinarske medicine završio je 2000. godine na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu gdje je i doktorirao 2009. godine na temu neinvazivnog praćenja aktivnosti nusbubrežne žlijezde jelena lopatara, kao znanstveni novak na projektu MZOS-a "Primijenjena biomedicinska istraživanja jelena naših staništa". 2010. godine postao je europski veterinarski specijalist zoološke medicine stekavši time pravo na titulu Diplomate of the European College of Zoological Medicine. Od 2011. godine je u zvanju znanstvenog savjetnika u području biomedicina i zdravstvo, znanstveno polje veterinarska medicina. 2013. godine održao je nastupno predavanje na temu "Primijenjena veterinarska epidemiologija" te je izabran u zvanje docenta na Zavodu za veterinarsku ekonomiku i epidemiologiju Veterinarskog fakulteta. U zvanje izvanrednog profesora izabran je 2018. godine. Od listopada 2016. do listopada 2022. godine obnašao je dužnost prodekana za znanost, poslijediplomske studije i cjeloživotno učenje, a u dijelu mandata i dužnost zamjenika Dekana. Bio je član Vijeća biomedicinskog područja i član Povjerenstva za izbore u znanstveno-nastavna zvanja istoga Vijeća. Usavršavao se pri University of Veterinary Medicine and Pharmacy Košice, Slovačka; University of Guelph, Ontario Veterinary College, Kanada; European College of Veterinary Pathology, Legnaro, Italija. Dobitnik je stipendije Vlade Republike Slovačke za usavršavanje. Član je uredničkog odbora časopisa Hrvatski veterinarski vjesnik i časopisa European Journal of Wildlife Research, kao i recenzentskog odbora časopisa Frontiers in Veterinary Medicine. Bio je voditelj dva projekta Hrvatske zaklade za znanost, jednog projekta Ministarstva poljoprivrede (VIP) i jednog ESF projekta, kao i voditelj radnih paketa na projektima IPA i FP7. Voditelj je poslijediplomskog specijalističkog studija na engleskom jeziku "Wildlife Health and Management" te obveznih predmeta na studije veterinarske medicine "Veterinary Epidemiology" i "Introduction to Veterinary Medicine", kao i izbornog predmeta na hrvatskom jeziku "Komparativna odontologija". Voditelj je i rezident programa ECZM na Veterinarskom fakultetu. Do sada je vodio 13 diplomskih radova i pet obranjenih doktorskih radova, dva rada nagrađena Rektorovom nagradom, te desetak mini-usavršavanja studenata Ecole Nationale Veterinaire de Toulouse. Recenzent je za više časopisa te je bio član panela Hrvatske zaklade za znanost. Prema bazi Scopus objavio je kao autor ili koautor 94 znanstvena rada. Kao koautor sudjelovao je u objavi četiri Sveučilišna udžbenika. Bio je predsjednik organizacijskog ili znanstvenog odbora te član odbora više međunarodnih kongresa. Oženjen je i otac dvoje djece.

SAŽETAK

**POVEZANOST POLIMORFIZMA LOKUSA DRB GLAVNOG SUSTAVA TKIVNE  
PODUDARNOSTI OBIČNE SRNE (*Capreolus capreolus*) S INVAZIJOM VELIKIM  
AMERIČKIM METILJEM (*Fascioloides magna*)**

Ida Svetličić

Zavod za animalnu fiziologiju, Biološki odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet u Zagrebu

Geni glavnog sustava tkivne podudarnosti (MHC) imaju važnu ulogu u adaptivnoj imunosti, budući da kodiraju molekule koje limfocitima T prezentiraju antigene uzročnika bolesti. Najznačajnija karakteristika gena MHC je njihova izrazita varijabilnost, a smatra se da je glavna evolucijska sila koja pokreće i održava tu varijabilnost selekcija posredovana uzročnicima bolesti. Veliki američki metilj (*Fascioloides magna*) nezavičajni je nametnik u Europi čije nedavno širenje predstavlja prijetnju populacijama obične srne (*Capreolus capreolus*), jer kao aberantni nositelji u pravilu ne preživljavaju invaziju. U ovom istraživanju genotipiziran je lokus DRB skupine II gena MHC u 138 jedinki srne iz Hrvatske kako bi se istražila razina varijabilnosti. Ispitane su tri različite metode genotipizacije te je tehnologija sekvenciranja Illumina izabrana kao najoptimalnija. Broj utvrđenih alela (10), kao i indeksi genetičke raznolikosti ukazuju na umjerenu razinu varijabilnosti. Provedbom istraživanja prema principu „slučaj-kontrola“ uspoređeni su obrasci polimorfizma lokusa DRB s invazijom velikim američkim metiljem pri čemu je za alel Caca-DRB\*0303 utvrđena statistički značajno ( $p < 0,01$ ) veća prisutnost u skupini srna s područja na kojem je potvrđena fascioloidoza.

Rad sadrži: 111 stranica, 26 slika, 21 tablica, 184 literaturna navoda, jezik izvornika hrvatski

Ključne riječi: geni MHC, genetička raznolikost, NGS, porodica Cervidae, fascioloidoza

Mentori: izv. prof. dr. sc. Ana Galov, izv. prof. dr. sc. Dean Konjević

Ocjenjivači: prof. dr. sc. Zorana Grubić

prof. dr. sc. Zdravko Janicki

dr. sc. Lucija Šerić Jelaska

ABSTRACT

**THE ASSOCIATION BETWEEN MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX  
DRB LOCUS POLYMORPHISM IN ROE DEER (*Capreolus capreolus*) AND LARGE  
AMERICAN LIVER FLUKE (*Fascioloides magna*) INFECTION**

Ida Svetličić

Division of Animal Physiology, Department of Biology, Faculty of Science, University of Zagreb

Major histocompatibility complex genes (MHC) have an important role in adaptive immunity since they code for molecules which present pathogen-derived antigens to T lymphocytes. The most significant characteristic of MHC genes is their marked variability, and it is considered that the main evolutionary force that initiates and maintains this variability is pathogen mediated selection. The large American liver fluke (*Fascioloides magna*) is a non-native parasite in Europe whose recent spread poses a threat to the populations of roe deer (*Capreolus capreolus*), considering that roe deer as aberrant carriers usually do not survive the invasion. In this study, DRB locus of the MHC class II was genotyped in 138 roe deer from Croatia, in order to investigate the level of variability. Three different genotyping methods were tested and Illumina sequencing technology was chosen as the most optimal. The number of determined alleles (10), as well as the indices of genetic diversity, indicate a moderate level of variability. During our research conducted using the case-control method, polymorphism patterns at the DRB gene were compared with the occurrence of great American liver fluke infection, and it was found that the Caca-DRB\*0303 allele exhibited a statistically significant ( $p < 0.01$ ) higher presence in the group of roe deer from the area where fascioloidosis was confirmed.

Ph.D. thesis contains: 111 pages, 26 figures, 20 tables, 184 references, original in Croatian

Key words: MHC genes, genetic diversity, NGS, family Cervidae, fascioloidosis

Supervisor: Ana Galov, PhD, Associate Professor, Dean Konjević, PhD, Associate Professor

Reviewers: Zorana Grubić, PhD, Professor

Zdravko Janicki, PhD, Professor

Lucija Šerić Jelaska, PhD



# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. LITERATURNI PREGLED</b> .....	<b>5</b>
2.1. Geni glavnog sustava tkivne podudarnosti (MHC).....	5
2.1.1. Najvažnije značajke gena MHC .....	8
2.1.2. Značajke gena MHC kod različitih vrsta.....	9
2.1.3. Geni MHC u istraživanjima.....	12
2.1.4. Metode genotipizacije MHC .....	12
2.1.5. Istraživanja povezanosti gena MHC i parazita .....	15
2.2. Obična srna ( <i>Capreolus capreolus</i> ).....	18
2.2.1. Bolesti i nametnici obične srne.....	23
2.2.2. Istraživanja gena MHC u srna i drugih vrsta porodice jelena ( <i>Cervidae</i> ).....	24
2.3. Veliki američki metilj ( <i>Fascioloides magna</i> ).....	25
2.3.1. Sistematika i morfološke značajke .....	25
2.3.2. Životni ciklus.....	28
2.3.3. Patološke i epidemiološke značajke .....	29
2.3.4. Geografska rasprostranjenost .....	34
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	<b>38</b>
3.1. Prikupljanje uzoraka obične srne .....	38
3.2. Makroskopski pregled jetre.....	40
3.3. Izolacija DNA .....	41
3.4. Lančana reakcija polimerazom.....	41
3.5. Usporedba metoda genotipizacije .....	43
3.5.1. Molekularno kloniranje .....	43
3.5.2. Platforma Ion Torrent .....	46
3.5.3. Platforma Illumina.....	47
3.5.4. Analiza sirovih podataka NGS .....	47

3.6.	Procjena genetičke raznolikosti.....	49
3.7.	Testovi selekcije i rekombinacije.....	50
3.8.	Evolucijski odnosi.....	52
3.9.	Povezanost alela DRB s prisutnošću velikog američkog metilja.....	53
<b>4.</b>	<b>REZULTATI.....</b>	<b>55</b>
4.1.	Potvrda prisutnosti metilja parazitološkom pretragom jetre obične srne.....	55
4.2.	Usporedba metoda genotipizacije lokusa DRB u obične srne.....	55
4.3.	Aleli i genotipovi lokusa DRB glavnog sustava tkivne podudarnosti.....	60
4.4.	Indeksi genetičke raznolikosti lokusa DRB.....	68
4.5.	Test AMOVA i genetička diferencijacija među skupinama.....	72
4.6.	Selekcija i rekombinacija.....	73
4.7.	Evolucijski odnosi.....	76
4.8.	Povezanost alela Caca-DRB s prisutnošću velikog američkog metilja.....	79
<b>5.</b>	<b>RASPRAVA.....</b>	<b>82</b>
<b>6.</b>	<b>ZAKLJUČCI.....</b>	<b>91</b>
<b>7.</b>	<b>LITERATURA.....</b>	<b>92</b>
<b>8.</b>	<b>PRILOZI.....</b>	<b>106</b>
<b>9.</b>	<b>ŽIVOTOPIS.....</b>	<b>111</b>

## 1. UVOD

Odnos nositelj-parazit složena je interakcija u kojem su organizmi povezani jedni s drugima i ekološki i evolucijski (Gandon i Michalakis 2002; Olano i sur. 2011). Seleksijski pritisak parazita pokreće genetske prilagodbe nositelja koje nastoje umanjiti mogućnost i posljedice invazije, zauzvrat prisiljavajući parazite da se iznova prilagode svojim nositeljima, što rezultira stalnom koevolucijom. Ovaj koevolucijski proces jedan je od najvažnijih pokretača genetske raznolikosti unutar populacija i vrsta, ali je odgovoran i za postojanje jednakih genetskih varijanti među različitim vrstama (Spurgin i Richardson 2010; Ebert i Fields 2020). Promjene u varijabilnosti gena odgovornih za imunost organizama uzrokovane koevolucijom nositelj-parazit dobro su dokumentirane u kralježnjaka (Bernatchez i Landry 2003; Eizaguirre i sur. 2012). Geni glavnog sustava tkivne podudarnosti (MHC) imaju ključnu ulogu u stečenom imunom odgovoru, budući da kodiraju molekule koje limfocitima T prezentiraju antigene određenih uzročnika bolesti te tako pokreću odgovarajuću imunostnu reakciju. Geni MHC mogu se podijeliti u dvije skupine – skupinu I i II. Molekule MHC skupine I vežu antigene dobivene iz intracelularnih patogena i stanica raka, dok molekule MHC skupine II imaju važnu ulogu u imunostnoj obrani od izvanstaničnih patogena budući da prezentiraju antigene parazita i bakterija. Glavna karakteristika gena MHC je njihova izrazita varijabilnost, koja je omogućila da postanu važni molekularni markeri u konzervacijskoj biologiji i evolucijskim istraživanjima (Sommer 2005). Smatra se da je selekcija posredovana uzročnicima bolesti (ili patogenima) glavna evolucijska sila koja održava visoku razinu varijabilnosti gena MHC (Spurgin i Richardson 2010). Pozitivna korelacija između varijabilnosti gena MHC i otpornosti na uzročnike bolesti dokazana je u različitim istraživanjima. Brze promjene učestalosti alela MHC koji proizlaze iz specifičnog pritiska parazita nužan su preduvjet u procesu adaptacije nositelja (Phillips i sur. 2018).

Veliki američki metilj (*Fascioloides magna*) nezavičajni je parazit u Europi, unesen krajem devetnaestog stoljeća uvozom sjevernoameričkih vrsta jelena. Od tada je metilj uspostavio stalna prirodna žarišta u srednjoj Europi, a noviji podaci pokazuju rast populacije ovog parazita i širenje u nova staništa. U Europi postoje tri tipa divljih konačnih nositelja: tipični (obični jelen *Cervus elaphus* i jelen lopatar *Dama dama*), aberantni (obična srna *Capreolus capreolus*, muflon *Ovis musimon* i divokoza *Rupicapra rupicapra*) i tip „slijepa

ulica“ (divlja svinja *Sus scrofa*). Aberantni nositelji imaju najnepovoljniji tijek invazije jer juvenilni metilj nastavlja s migracijom kroz parenhim jetre uslijed čega nastaju teška oštećenja tkiva, jaka krvarenja i smrt životinje (Králová-Hromadová i sur. 2016). Jedina vrsta u skupini aberantnih nositelja u Hrvatskoj je obična srna, donedavno najrasprostranjenija vrsta divljači u Hrvatskoj. U posljednjem desetljeću, međutim, populacija obične srne dramatično se smanjila na područjima Slavonije, Baranje i Posavine. Porast invazije velikim američkim metiljem ističe se kao jedan od važnijih čimbenika takvog populacijskog trenda (Konjević i sur. 2021). Nedavni nalazi kronične invazije u srna, međutim, dokazuju da u posljednje vrijeme sve veći broj srna uspijeva preživjeti početnu invaziju, što ukazuje na mogućnost funkcionalnih prilagodbi na parazita (Konjević i sur. 2021). To je dodatno vidljivo i u nalazu Filip-Hutsch i sur. (2022) koji su pronašli jajašca ovoga metilja u izmetu obične srne. Analizom gena MHC obične srne možemo procijeniti adaptivnu genetičku raznolikost koja omogućuje dugoročni opstanak potencijalno ugroženih populacija. Također, istraživanje gena MHC omogućuje bolje razumijevanje ove genetske varijabilnosti te imunološkog odgovora i povezanih evolucijskih procesa.

U ovom istraživanju, po prvi puta su analizirani geni MHC obične srne u Republici Hrvatskoj i dobiveni su podaci o njihovoj raznolikosti. U prvom dijelu istraživanja ispitane su tri različite metode genotipizacije lokusa DRB gena MHC u obične srne s ciljem optimizacije analize te je tako stvoren temelj za daljnje postupke genotipizacije lokusa DRB u obične srne korištenjem Illumina tehnologije sekvenciranja. Kako je glavni poticaj za adaptaciju na lokusima MHC upravo selekcijski pritisak uzročnika bolesti, rezultati ovog istraživanja dat će uvid u sposobnost preživljavanja populacije obične srne u Hrvatskoj s obzirom na prijetnju koju za njih predstavlja veliki američki metilj. Nadalje, istražen je selekcijski pritisak na populaciju obične srne u Hrvatskoj u različitim vremenskim rasponima te su ispitani evolucijski odnosi između pronađenih alela DRB koji uvjetuju genetičku raznolikost.

S obzirom na činjenicu da je veliki američki metilj nezavičajni nametnik koji još uvijek nije potvrđen na prostoru cijele Republike Hrvatske, moguće je provesti istraživanje na principu slučaj-kontrola. Pri tome je u kontrolnoj skupini isključena mogućnost pogreške uvjetovane potencijalnim invazijama roditeljskih generacija i nasljeđivanjem genskih osobina jer u prošlosti nije bilo kontakta s nametnikom. U kontrolnoj skupini (negativna skupina) nalaze se srne s područja na kojem do trenutka uzorkovanja nije ustanovljena fascioloidoza. U skupini slučaj (pozitivna skupina) nalaze se srne s područja na kojem je potvrđena fascioloidoza. Na

ovaj način moguće je usporediti obrasce genetičke raznolikosti gena MHC na razini ovih dviju skupina.

Glavni cilj ovog istraživanja je ispitati specifične obrasce genetičke raznolikosti uočene kod gena povezanih s imunitetom (MHC) u obične srne na području Republike Hrvatske s obzirom na prisutnost velikog američkog metilja.

Specifični ciljevi istraživanja su:

1. Potvrditi prisutnost ili odsustvo fascioloidoze u obične srne na istraženim područjima
2. Usporediti metode genotipizacije lokusa DRB s ciljem optimizacije analize
3. Odrediti alele i genotipove DRB svih analiziranih jedinki
4. Izračunati indekse genetičke raznolikosti u ukupnom uzorku, kao i u skupinama slučaj i kontrola
5. Odrediti učestalost heterozigota i testirati višak heterozigotnosti kao odstupanje od Hardy-Weinbergove ravnoteže
6. Ispitati genetičku diferencijaciju među skupinama pomoću testa AMOVA
7. Utvrditi djelovanje pozitivne selekcije na utvrđenim alelima te rasvijetliti evolucijske odnose među alelima obične srne i alelima drugih vrsta porodice jelena
8. Testirati korelaciju između pojedinih alela DRB i invazije velikim američkim metiljem

Pretpostavka istraživanja je da je invazija običnih srna velikim američkim metiljem uzrokovala promjene na razini gena MHC u vidu postojanja specifičnih obrazaca genetičke raznolikosti lokusa DRB na invadiranom području, ukazujući tako na početak prilagodbe srna na ovog nezavičajnog nametnika.

U istraživanju su korišteni uzorci jetara 138 običnih srna prikupljeni metodom stratificiranog uzorkovanja u okviru provedbe projekta Hrvatske zaklade za znanost IP 8963 „Interakcija nositelj-parazit: odnos tri različita tipa nositelja prema invaziji metiljem *Fascioloides magna* (MAGNA)“. Uzorci su podijeljeni na pozitivnu skupinu, odnosno skupinu s područja na kojem je ustanovljena fascioloidoza i negativnu, kontrolnu skupinu. Na čitavom uzorku i pojedinim skupinama istražena je varijabilnost eksona 2 lokusa DRB. Upotrebom odgovarajućih računalnih programa analizirani su pokazatelji nukleotidnog i aminokiselinskog

polimorfizma alela lokusa DRB, istraženo je djelovanje prirodne selekcije te pokazatelji molekularne evolucije. Također je ispitana korelacija učestalosti utvrđenih alela s prisutnošću/odsutnošću invazije velikim američkim metiljem pomoću prikladnih statističkih testova. Prikupljene jetre obične srne podvrgnute su parazitološkoj pretrazi te je iz tkiva jetre izolirana genomska DNA. Lokus DRB izabran je kao glavni pokazatelj raznolikosti gena MHC zbog toga što kod srna i drugih pripadnika porodice jelena predstavlja najpolimorfiji lokus skupine II. Odsječak eksona 2 lokusa DRB duljine 249 pb umnožen je korištenjem početnica LA31 i LA32 (Sigurdardóttir i sur. 1991), koje su prethodno uspješno korištene u drugim istraživanjima eksona 2 lokusa DRB obične srne (Mikko i sur. 1999; Quéméré i sur. 2015; Bužan i sur. 2022; Svetličić i sur. 2022). Zbog delecije kodona nije bilo moguće genotipizirati heterozigotne jedinke upotrebom isključivo Sangerovog sekvenciranja te je provedena usporedba metoda genotipizacije s ciljem utvrđivanja optimalne metode. Uspoređene su metode molekularnog kloniranja, te metode sekvenciranja nove generacije na Illumina i Ion Torrent platformi.

Usporedbom metoda utvrđeno je kako je najoptimalnije rezultate pokazivalo sekvenciranje nove generacije na Illumina platformi te su preostali uzorci sekvencirani ovom metodom. Za obradu podataka korišten je AmpliSAT web alat (Sebastian i sur. 2016) što je uključivalo spajanje sirovih očitavanja, filtriranje prema kvaliteti i duljini sekvence te finalno određivanje alela DRB. Broj nukleotidnih varijabilnih mjesta, nukleotidni diverzitet i srednji broj uparenih razlika između utvrđenih alela određen je pomoću programa DnaSp (Librado i Rozas 2009), a nukleotidne i aminokiselinske evolucijske udaljenosti izračunate su u programu MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis (Kumar i sur. 2018). Alelna bogatstvo, mjera očekivanog broja alela uz pretpostavku najmanjeg uzorka, određena je u programu FSTAT (Goudet 2002). Odstupanje od Hardy-Weinbergove ravnoteže testirano je pomoću egzaktnog testa u programu Arlequin (Excoffier i sur. 2005), koji je također upotrijebljen i za Ewen-Watterson test selekcije i analizu molekularne varijance (AMOVA) (Raymond i Rousset 1995). Za detaljnije ispitivanje uloge prirodne selekcije korištene su metode u programu EasyCodeML (Gao i sur. 2019) i modeli dostupni u sklopu HyPhy programskog paketa (Martin i sur. 2010). Za određivanje intralokusnih rekombinantnih događaja također je upotrijebljen HyPhy programski paket, odnosno u njega implementirana metoda GARD (Kosakovsky Pond i sur. 2020) Evolucijski odnosi između alela DRB istraženi su konstrukcijom filogenetskog stabla u programu MEGA i median-joining haplotipske mreže u programu Network (Bandelt i sur. 1999). Za ispitivanje korelacije alela DRB pronađenih u jedinki s pozitivnog područja, odnosno onih s negativnog područja, korišteni su statistički testovi jednakosti proporcija.

Testovi su provedeni u programskom jeziku R (R x64 3.6.1). Hi-kvadrat ( $\chi^2$ ) testom o homogenosti testirana je razdioba alela unutar pozitivne i negativne skupine.

## 2. LITERATURNI PREGLED

### 2.1. Geni glavnog sustava tkivne podudarnosti (MHC)

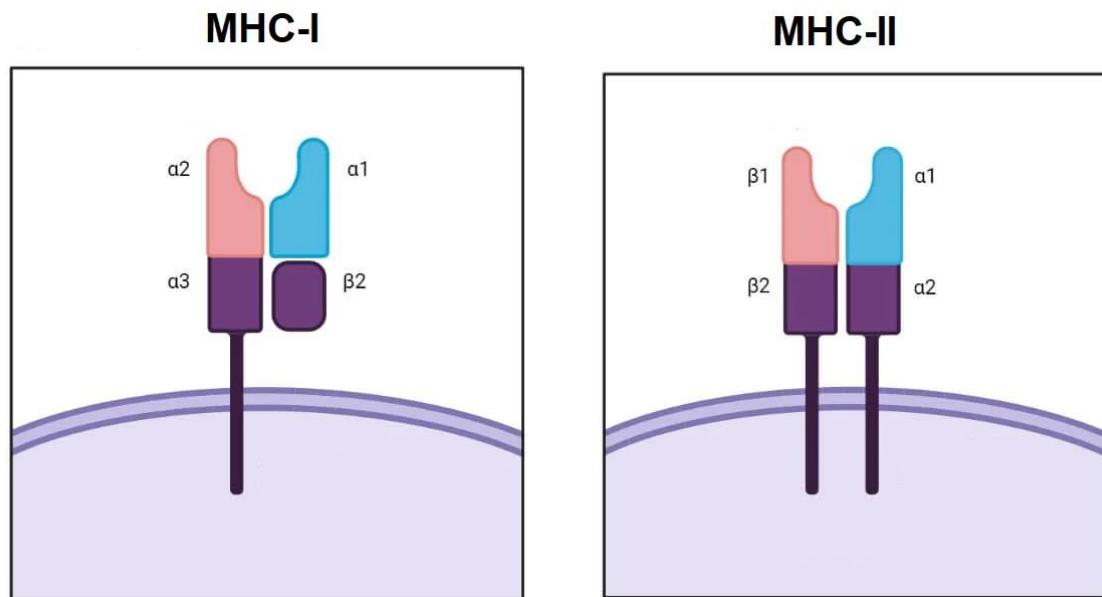
Glavni sustav tkivne podudarnosti (engl. Major histocompatibility complex, MHC) je sustav glikoproteinskih membranskih receptora izraženih na stanicama čeljustoustih kralježnjaka. Ovaj sustav kodiran je genima MHC koji čine dio kompleksne genske regije. Svoj naziv geni i molekule MHC duguju tome što su ključne za imunološku podudarnost koja je preduvjet uspješne transplantacije tkiva. Prepoznavanje transplantiranih tkiva od strane imunskog sustava odražava njegovu sposobnost razlučivanja vlastitih od stranih antigena u svrhu borbe protiv infekcija ili invazija. Središnju ulogu u prepoznavanju tkiva imaju molekule MHC jer omogućuju preradu i prikazivanje antigena limfocitima T što pokreće odgovarajući adaptivni imunološki odgovor. Molekule MHC pritom formiraju trodimenzionalnu strukturu na površini stanice koja se sastoji od vlastitih proteinskih lanaca na koje su vezani prerađeni peptidni antigeni iz ekstracelularnog ili intracelularnog prostora. Potom limfocit T prepoznaje trodimenzionalni kompleks antigena i molekule MHC spregnuto, tako da jednim dijelom prepoznaje antigen, a drugim vlastitu molekulu MHC (Wilkes i Burlingham 2004) .

Najvažnije molekule (i gene) MHC možemo podijeliti na skupinu I i II (slika 1). Molekule MHC-I sudjeluju u obrani organizma od virusa i ostalih intracelularnih uzročnika bolesti, a izražene su na površini svih stanica koje posjeduju jezgru. Prerada endogenih peptida koje molekule MHC-I vežu uključuje ubikvitinaciju proteina, dovođenje do citosola i proteasoma, degradaciju te transport do lumena endoplazmatskog retikuluma i potom do površine stanice gdje ih prepoznaju citotoksični limfociti T, odnosno CD8, i stanice ubojice (engl. Natural killer, NK) (Pamer i Cresswell 1998) (slika 2). Na taj način molekule MHC reguliraju izvršnu ulogu i adaptivnog i urođenog imunološkog sustava. U svom potpunom, funkcionalnom obliku koji je izražen na staničnoj membrani, molekula MHC-I je heterotrimer sastavljen od polimorfnog teškog  $\alpha$ -lanca nekovalentno vezanog s nepolimorfnim  $\beta$ 2-mikroglobulinom i vezanog antigenskog peptida. Dijelovi molekule mogu se podijeliti i na citoplazmatski dio, transmembranski dio, dio sličan imunoglobulinu i dio lanca  $\alpha$  koji veže peptid (domene  $\alpha$ 1 i

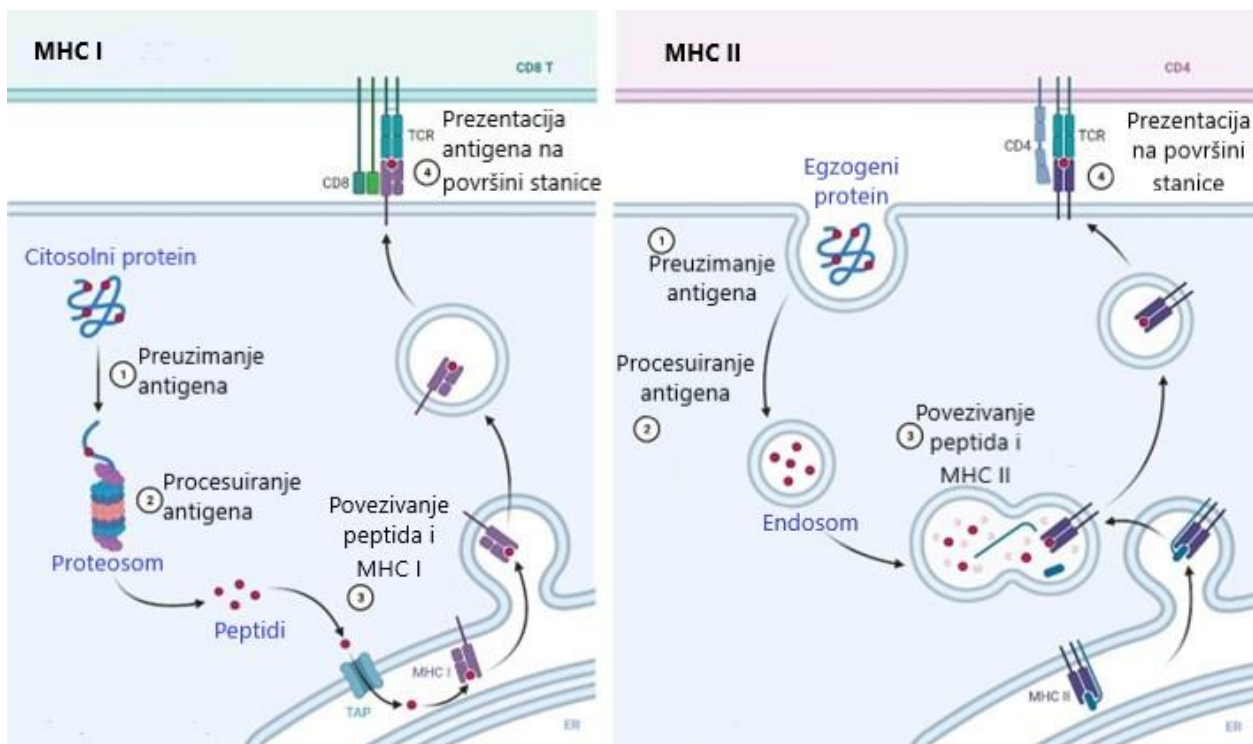
$\alpha 2$ ) (Andreis i sur. 1998) (slika 1). Domena  $\alpha 3$  i  $\beta 2$ -mikroglobulin čine dio sličan imunoglobulinu koji se nalazi blizu membrane, pri čemu je  $\beta 2$ -mikroglobulin nužan za ekspresiju molekule MHC-I na površini stanice, dok domena  $\alpha 3$  ima vezni dio za CD8 (Andreis i sur. 1998). Dio MHC-I koji veže peptid ima zatvorene krajeve pa stoga ovaj tip molekula MHC može vezati samo peptide ograničene duljine od osam do 10 aminokiselina (Falk i sur. 2002).

S druge strane, kod molekula MHC-II, ekspresija samih receptora te prerada i prikazivanje antigena ograničeni su samo na određene somatske stanice koje uključuju makrofage, dendritične stanice, Langerhansove stanice, timusne epitelne stanice i limfocite B (Wilkes i Burlingham 2004). Uloga molekula MHC-II je prezentiranje ekstracelularnih peptidnih antigena pomagačkim CD4 limfocitima T pa na taj način sudjeluju u obrani od bakterija i parazita. Prerada ekstracelularnih peptida koje MHC-II vežu uključuje endocitozu proteina, endosome ili lizosome, denaturaciju, redukciju disulfidnih mostova, protelitičko cijepanje i katalitičku razmjenu novostvorenih peptida te njihovu prezentaciju u obliku kompleksa s vlastitim molekulama MHC-II na površini stanice (slika 2). Ove molekule građene su od teškog  $\alpha$  i lakšeg  $\beta$  lanca koji čine 4 funkcionalne domene  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta 1$  i  $\beta 2$ . Dio molekule koji veže antigen ovdje zajedno tvore lanci  $\alpha$  i  $\beta$  sa svojim domenama  $\alpha 1$  i  $\beta 1$  (slika 1). Preostale domene ( $\alpha 2$  i  $\beta 2$ ) sudjeluju u nekovalentnom vezanju lanaca  $\alpha$  i  $\beta$  te interakciji s CD4 limfocitima (Andreis i sur. 1998). Kod MHC-II, dio molekule koji veže antigen ima otvorene krajeve pa stoga može vezati i peptide duljine veće od 10 do 12 aminokiselina (Wilkes i Burlingham 2004).





Slika 1. Shematski prikaz strukture molekula MHC-I i MHC-II (preuzeto iz <https://microbenotes.com/mhc-molecules/>)



Slika 2. Proces prerade i prezentacije antigena kod molekula MHC-I i MHC-II (preuzeto i prilagođeno iz <https://microbenotes.com/mhc-molecules/>)

### 2.1.1. Najvažnije značajke gena MHC

Geni MHC nasljeđuju se prema Mendelovima principima te imaju kodominantni obrazac ekspresije. Druga važna obilježja ovih gena su ekstremni polimorfizam, višak nesinonimnih mutacija u odnosu na sinonimne te održavanje određenih genskih varijanti kroz dugo evolucijsko razdoblje (Radwan i sur. 2020). Ekstremni polimorfizam gena MHC posebice je izražen u regiji koja kodira domenu za vezanje antigena (engl. peptide-binding domain – PBD) (Sommer 2005). Posljedično, molekule kodirane različitim alelima MHC razlikuju se u svojstvima vezanja pojedinih antigena, što utječe na podložnost uzročnicima bolesti i može dugoročno utjecati na vjerojatnost preživljavanja populacije (Radwan i sur. 2020). Regija PBD pokazuje visoke razine polimorfizma ne samo u broju alela nego i u opsegu razlika između pojedinih nukleotidnih sekvenci (Hughes i Yeager 1998) te su geni MHC najpolimorfiji kodirajući lokusi u genomu kralježnjaka (Sommer 2005). Također, lokusi skupine I i II su umnoženi kod mnogih vrsta (Klein i Figueroa 1986). Ukupnoj varijabilnosti molekula MHC na taj način pridonose i polimorfizam pojedinog lokusa i veći broj eksprimiranih lokusa.

Polimorfizam ove regije nastaje adaptivnom evolucijom, odnosno djelovanjem pozitivne selekcije, što je vidljivo kao višak nesinonimnih u odnosu na sinonimne mutacije (Bernatchez i Landry 2003). Smatra se da je glavni poticaj za adaptaciju na lokusima MHC upravo selekcijski pritisak uzročnika bolesti (Sommer 2005). Specijalni tip pozitivne selekcije koji održava velik broj različitih alela u populaciji kroz dugo evolucijsko razdoblje naziva se ravnotežna selekcija. Predložena su dva osnovna mehanizma djelovanja ravnotežne selekcije: heterozigotna prednost i prednost rijetkih alela tj. selekcija ovisna o učestalosti (Hughes i Nei 1988; Takahata i Nei 1990). Naknadno je uveden i treći potencijalni mehanizam nazvan fluktuirajuća selekcija kroz prostor i/ili vrijeme (Hill 1991; Hedrick 2002). Mehanizam heterozigotne prednosti objašnjava višak heterozigotnosti često dokumentiran kod lokusa MHC (Radwan i sur. 2020). Budući da različite molekule MHC vežu različite antigene, a heterozigoti imaju veću raznolikost molekula MHC koje mogu prezentirati veći broj antigena, razumljivo je da se takva jedinka potencijalno može obraniti od šireg spektra uzročnika bolesti u usporedbi s homozigotnim jedinkama (Borghans i sur. 2004). Ipak, previsoka varijabilnost gena MHC na individualnoj razini može imati i negativne posljedice na raznolikost limfocita T jer može dovesti do reakcija između limfocita T i kompleksa vlastitih antigena s molekulama MHC (Nowak i sur. 1992). Upravo limfociti T koji snažno reagiraju s takvim kompleksima eliminiraju se u procesu negativne selekcije nakon sazrijevanja u timusu, s ciljem izbjegavanja imunodne samoreaktivnosti. U tom slučaju optimalna, a ne maksimalna heterozigotnost nudi

najveću prednost za preživljavanje i takozvani fitness jedinke (Spurgin i Richardson 2010). Hipoteza selekcije ovisne o učestalosti temelji se na neprestanoj koevoluciji uzročnika bolesti i njihovih domaćina/nositelja. Uzročnici bolesti se prilagođavaju kako bi optimalno iskoristili domaćine/nositelje s najčešćim genotipovima pa oni nositelji koji imaju rijetke alele imaju selektivnu prednost. S vremenom jedinke s rijetkim alelima postanu česte i uzročnici bolesti im se stoga nanovo prilagođavaju u stalnom i dinamičnom odnosu (Slade i McCallum 1992). Učestalost alela MHC i uzročnika bolesti na taj način varira, a ovaj ciklički proces na dinamičan način održava genetičku raznolikost (Spurgin i Richardson 2010). Pretpostavka fluktuirajuće selekcije navodi heterogenost u vrsti i brojnosti uzročnika bolesti u prostoru i vremenu kao mehanizam održavanja raznolikosti na razini gena MHC (Hill 1991). U slučaju da selekcija uzročnicima bolesti fluktuiru u prostoru i vremenu, selekcijski pritisak na gene MHC će također fluktuirati što će dovesti do selekcije različitih alela u određenim vremenskim ili prostornim točkama i do održavanja raznolikosti MHC diljem subpopulacija. Kod ovog mehanizma selekcija nije ciklička već je usmjerena te su fluktuacije u selekciji uzročnika bolesti ovisne o vanjskim, odnosno abiotičkim faktorima (Spurgin i Richardson 2010). Reproductivni mehanizmi kao što je disasortativno parenje i interakcije preko majčine posteljice vjerojatno također pridonose očuvanju raznolikosti MHC (Penn i Potts 1999).

Važna značajka gena MHC je i nenasumično nasljeđivanje alela na dva ili više lokusa, što se naziva neravnoteža vezanosti gena (engl. linkage disequilibrium) (Lewontin i Kojima 1960). Neravnoteža vezanosti gena izražena je kao značajno viša ili niža učestalost određenih haplotipova, odnosno kombinacija alela, nego što se očekuje kod individualnih alelnih učestalosti. Održavanje tih kombinacija alela doprinosi selektivnoj prednosti jedinkama koje ih nose i omogućuje očuvanje određenih haplotipova MHC u populaciji. Način na koji je neravnoteža vezanosti gena izražena razlikuje se u pojedinim populacijama i ovisi o evolucijskoj povijesti. Duga generacijska povijest panmiksije smanjuje izraženost neravnoteže vezanosti i približava populaciju ravnoteži učestalosti alela. Postotak rekombinacije zbog blizine lokusa relativno je nizak te iznosi 2 – 4% (Costantino i sur. 2017).

### 2.1.2. Značajke gena MHC kod različitih vrsta

Komponente adaptivnog imunskog sustava, uključujući gene MHC, razvile su se rano u evoluciji kralježnjaka, no detalji o tom procesu još nisu u potpunosti razjašnjeni. Adaptivna imunost najvjerojatnije se razvila prije otprilike 450 milijuna godina u pretka čeljustoustitih kralježnjaka. Molekule MHC ne nalazimo kod beskralježnjaka dok prvi čeljustoustiti kralježnjaci

već posjeduju gene MHC-I i MHC-II (Kumánovics i sur. 2003). Prototip regije MHC kojem nedostaju geni MHC-I i MHC-II pronađeni su kod kopljače (Trowsdale i Knight 2013). Regije koje kodiraju za molekule skupine I i II obično su genetički povezane, odnosno nalaze se na istoj kromosomskoj regiji. Iznimku čine ribe koštunjače, kod kojih se skupine MHC-I i MHC-II nalaze na različitim kromosomskim regijama unutar jednog kromosoma ili čak različitim kromosomima (Sato i sur. 2000). Struktura i funkcija molekula MHC-I i MHC-II te receptora za vezanje antigena evolucijski su očuvane unatoč velikim promjenama u genskoj organizaciji tijekom evolucijske povijesti. Smatra se da se MHC čeljustustih kralježnjaka razvio tijekom drevnih kromosomalnih duplikacija koje su udvostručile odsječke velikih genskih regija, najvjerojatnije u dva neovisna ciklusa duplikacija nakon kojih je uslijedila genska reorganizacija i odbacivanje nekih gena. Funkcionalni geni MHC često su popraćeni brojnim pseudogenima, genskim fragmentima i ostacima koji ukazuju na turbulentnu evolucijsku povijest ove regije. Primjerom “minimalnog osnovnog MHC” smatra se jednostavan i kompaktan MHC kokoši, koji sadrži gene MHC zajedničke većini drugih vrsta, ali bez ikakvih dodatnih lokusa.

Kod čovjeka gensku regiju MHC pronalazimo na kratkom kraku (p-kraku) kromosoma 6 (u regiji 6p21.3), nazivamo ju HLA (engl. Human Leukocyte Antigen), a duljine je 3,6 Mb. Najvažniji geni ove regije su HLA-A, -B i -C (skupina I), te HLA-DQB1, DRB1, DP1 (skupina II) koji kodiraju receptor za vezivanje antigena i pokazuju najvišu razinu polimorfizma (Edgerly i Weimer 2018). Zahvaljući ulozi MHC u adaptivnoj imunosti i transplanataciji, ovi geni su vrlo dobro istraženi pa je tako sekvenca čitave regije HLA, uključujući anotaciju 224 gena, objavljena već 1999. godine (The MHC sequencing consortium 1999). Iako regija HLA čini svega 0,13% ljudskog genoma, poznato je da je povezana s mnogobrojnim autoimunim bolestima, kao što su dijabetes, artritis, psorijaza i astma. Također je utvrđena i snažna poveznica alela HLA i preosjetljivosti na određene lijekove (Hosomichi i sur. 2015), te nekih drugih zdravstvenih stanja, kao što su tumori i određene neuropatije (Trowsdale i Knight 2013). Navedene povezanosti često su indirektna, odnosno nastaju zbog specifičnih selekcijskih pritisaka na cjelokupni genom populacije. Općenito, niti jedna druga regija u genomu nema toliko utvrđenih poveznica s bolestima i drugim zdravstvenim stanjima kao MHC. Zbog značajka regije MHC, primjerice gustoće gena, snažne neravnoteže vezanosti gena, klasteriranja gena i ekstremnog polimorfizma, određivanje specifičnog alela, odnosno lokusa koji ima utjecaj na bolest ili stanje, često predstavlja metodološki izazov (Trowsdale i Knight 2013).

Sustav MHC prvi put je otkriven u miša pa su istraživanja na mišu kao najčešće korištenom životinjskom modelu u prošlosti poslužila kao temelj razumijevanja strukture i funkcije MHC. U miša je sustav MHC smješten na kromosomu 17, a u njemu pronalazimo brojne ortologe MHC-II primata i štakora. No, primijećeno je da su mišji geni DR u polovice sojeva pseudogeni, dok su geni DP uvijek nefunkcionalni pseudogeni. Također, miševi posjeduju veći broj funkcionalnih lokusa MHC-II, čak 30, dok ih čovjek ima samo devet (Kumánovics i sur. 2003).

Velik broj istraživanja također je posvećen sustavu MHC kod pasa, koji se naziva DLA (engl. Dog Leukocyte Antigen). U DLA MHC-I najbolje je istražen gen DLA-88 zbog velikog značaja u transplantaciji organa i tkiva. U skupini II najviše su istraženi geni DLA-DRB1, DQA1 i DQB te se psi najčešće karakteriziraju prema ovim trolokusnim haplotipovima. Umjetna selekcija koja je posljedica dugotrajnog uzgoja pasmina dovela je do specifičnih značajki DLA, u odnosu na gene MHC u divljih životinja. Zbog selektivnog uzgoja neke pasmine posjeduju vrlo ograničenu varijabilnost DLA, izraženu kao manji broj alela prisutnih u određenoj pasmini. Varijacija u imunom odgovoru između pojedinih pasmina, kao i aleli specifični za pasmine također su izravna posljedica uzgoja. Kao i u ljudi, utvrđena je povezanost nekih genotipova MHC i autoimunih bolesti, kao što je primjerice dijabetes (Angles i sur. 2005; Kennedy i sur. 2005; Catchpole i sur. 2008).

Geni MHC u goveda mapirani su na kromosom 23 i nazivaju se BoLA (engl. Bovine Leukocyte Antigen). MHC skupine II slično su organizirani kao kod ljudskih ortologa. Geni DQA i DQB su duplicirani i snažno vezani u većini haplotipova (Behl i sur. 2012). Geni -DR koji kodiraju za lanac  $\alpha$  pokazuju vrlo nisku varijabilnost, dok su geni za lanac  $\beta$  vrlo polimorfni. U goveda postoje barem tri DRB lokusa, no samo je jedan (DRB3) funkcionalni lokus. Lokus BoLA-DRB1 je pseudogen, dok je BoLA-DRB2 monomorfan i s vrlo niskom razinom ekspresije (Burke i sur. 1991).

S obzirom na to kako je broj novootkrivenih alela HLA rastao, a sve više su se počeli istraživati i geni MHC drugih vrsta, u početku samo modelnih životinja (miš, štakor), a kasnije su se istraživanja proširila i na domaće životinje (pas, mačka, konj, govedo, svinja) i naposljetku na divlje životinje, pojavila se potreba za sistematiziranim pohranjivanjem tih podataka. Projekt Immuno Polymorphism Database (IPD) omogućio je uspostavljanje i održavanje baze podataka vezane za gene MHC u brojnih vrsta, a danas se sastoji od 5 različitih baza, među kojima se izdvajaju IPD-IMGT/HLA baza podataka s ljudskim alelima MHC i IPD-MHC s alelima različitih životinjskih vrsta. U podnošenju podataka u IPD sudjeluju brojni odbori za nomenklaturu, koji omogućuju kontinuirano sistematično nazivanje alela pojedinih

vrsta te grupe za bioinformatiku koje omogućuju pristup svim podacima putem javno dostupne web stranice (dostupno na <http://www.ebi.ac.uk/ipd/>) (Abraham i sur. 2018).

### 2.1.3. Geni MHC u istraživanjima

Procjene razine genetičke raznolikosti i istraživanja genetičke diferencijacije između i unutar populacija tradicionalno su provođena korištenjem selektivno neutralnih molekularnih markera kao što su mitohondrijska kontrolna regija, mikrosatelitski lokusi ili polimorfizmi jednog nukleotida (engl. single nucleotide polymorphism, SNP). Ipak, evolucijski važni adaptivni procesi izravno se odražavaju na regijama koje nisu neutralne, odnosno onim koje kodiraju proteinske produkte (Sommer 2005). Geni MHC su stoga u zadnja tri desetljeća postali važan marker za genetička istraživanja prirodnih populacija (Bernatchez i Landry 2003). Ekstremni polimorfizam i dokazi o djelovanju prirodne selekcije učinili su ih idealnim kandidatima za proučavanje kako selekcija može djelovati na održavanje adaptivno važne genetske raznolikosti (Sommer 2005). Zbog njihove važne uloge u imunosnoj obrani od uzročnika bolesti, geni MHC pokazali su se korisnim i u istraživanjima na kvantitativnim osobinama povezanim s ponašanjem i fitnessom u prirodnim populacijama. Evolucijska dinamika ovih gena postala je važna za populacijska, ekološka i konzervacijska istraživanja (Spurgin i Richardson 2010). U konzervacijskim nastojanjima s ciljem zaštite i očuvanja populacija, praćenje genetičke raznolikosti je ključno kako bi se omogućile potrebne mjere upravljanja, posebice kod manjih i fragmentiranih populacija (Leroy i sur. 2018). Unutar MHC-II, većina istraživanja u sisavaca provodi se na drugom eksonu gena DRB jer ti lokusi kodiraju za funkcionalno važne receptore koji vežu antigen (Ohta 1998). Geni skupine II blisko su povezani kod sisavaca i njihovi aleli pokazuju snažnu neravnotežu vezanosti. Stoga se smatra da je genetička varijabilnost dokumentirana na lokusu DRB dobar pokazatelj općenite varijabilnosti gena MHC-II i drugih blisko povezanih gena (Sommer 2005).

### 2.1.4. Metode genotipizacije MHC

Preduvjet za sva istraživanja funkcionalne varijabilnosti gena MHC je pravilna procjena alelne raznolikosti na razini jedinice. No zbog njihove kompleksnosti i ekstremnog polimorfizma, pravilna genotipizacija lokusa MHC predstavlja veliki izazov, posebice kod nemodelnih vrsta životinja (Babik 2010; Gillingham i sur. 2016; Marmesat i sur. 2016; Rekdal i sur. 2018). Nove tehnologije i metodološki pristupi djelomično su olakšali izazov

genotipizacije MHC, ali i sa sobom donijeli neke nove poteškoće. Prvi metodološki izazov kod procjene individualne MHC raznolikosti je dizajn početnica potrebnih za provedbu lančane reakcije polimerazom, a koje bi bile specifične za istraživani lokus (Marmesat i sur. 2016). On je često otežan zbog velike sličnosti između sekvenci različitih lokusa MHC i prisutnosti duplikacija, što može dovesti do istovremenog umnažanja alela različitih lokusa. Osim toga, može doći i do pristranosti kod umnažanja određenih alela zbog nejednolikog vezivanja početnica na jedne nukleotidne slijedove u odnosu na druge (Sommer i sur. 2013; Gillingham i sur. 2020).

Sve veći broj dostupnih genoma nemodelnih kralježnjaka pomaže otkloniti neke od ograničenja pri razvijanju početnica. Ipak, nukleotidni slijedovi većine genoma i danas su uglavnom dobiveni korištenjem kratkih očitavanja sekvenciranja nove generacije (engl. short read next-generation sequencing). Takvim načinom sekvenciranja kompleksne genske porodice kao što je MHC često ne mogu biti sklopljene (engl. assembled) i okarakterizirane do razine potrebne za dizajn početnica. U takvim slučajevima uglavnom se pribjegava upotrebi početnica razvijenih za bliske vrste (Lighten i sur. 2014; Marmesat i sur. 2016; Gillingham i sur. 2020). Nakon razvijanja početnica slijedi izbor metode sekvenciranja, koje se mogu podijeliti na tradicionalne i novorazvijene metode. U tradicionalne metode pripada molekularno kloniranje i Sangerovo sekvenciranje (Oomen i sur. 2013; Grogan i sur. 2016).

Sangerova metoda ili dideoksi metoda (Sanger i sur. 1973) temelji se na komplementarnoj ugradnji dideoksiribonukleozid-trifosfata (ddNTP), kemijskih analoga deoksiribonukleozid-trifosfata (dNTP) kojima nedostaje 3' hidroksilna skupina potrebna za produljenje lanaca DNA te je time onemogućeno povezivanje s 5' fosfatnom skupinom idućeg dNTP-u. Miješanje fluorescentno označenih ddNTP i neoznačenih dNTP nukleotida u reakciji produljenja lanca DNA rezultira dobivanjem lanaca svih mogućih duljina, jer nasumična ugradnja ddNTP prekida daljnju ugradnju nukleotida, te dotični fragment označava fluorescentnim ddNT nukleotidom čiji signal očitava računalo (Heather i Chain 2016). Iako Sangerova metoda ima brojne sličnosti s nekim drugim tehnikama prve generacije sekvenciranja kao što je primjerice Maxam-Gilbert metoda sekvenciranja, koja se temelji na kemijskom cijepanju lanaca terminalno obilježenih radioaktivnim nukleotidima (Maxam i Gilbert 1977) zbog svoje točnosti, jednostavnosti i robusnosti metode, Sangerovo sekvenciranje desetljećima je bila najčešće korištena tehnologija sekvenciranja. Ipak, Sangerovo sekvenciranje ne može razdvojiti pojedine sekvence alela MHC pa se stoga kod heterozigotnih jedinki alelne faze moraju razdvojiti pomoću vektora za kloniranje i pojedinačno sekvencirati. Ovaj pristup je obično vrlo dugotrajan i skup, posebno kod genotipizacije velikog

seta podataka i/ili vrsta s duplikacijom lokusa (Gillingham i sur. 2020). Ipak, zbog velike točnosti ova metoda se i dalje smatra zlatnim standardom u usporedbi s drugim metodama genotipizacije.

S druge strane, novo razvijene metode genotipizacije gena MHC oslanjaju se na upotrebu sekvenciranja nove generacije (engl. next-generation sequencing, NGS) poznatog i kao “masivno paralelno sekvenciranje”, u stvaranju velikog broja nukleotidnih slijedova (očitanja) po jedinki, što omogućuje identifikaciju svih umnoženih varijanti gena (Sommer i sur. 2013; Stutz i Bolnick 2014; Rekdal i sur. 2018). Na tržištu trenutno postoji nekoliko komercijalno dostupnih platformi za sekvenciranje NGS koje se razlikuju u duljini i broju očitavanja koje dosežu, kao i u specifičnim pogreškama koje nastaju tokom sekvenciranja.

Trenutno dominantnu tehnologiju na tržištu predstavlja platforma Illumina za sekvenciranje NGS koja se temelji na sekvenciranju sintezom. Prvi korak u Illumina sekvenciranju je priprema knjižnice (engl. library) koja se nanosi na protočnu komoricu (engl. flow cell). Na protočnu komoricu vežu se nizovi jednolančanih fragmenta DNA te se umnažaju takozvanom “amplifikacijom stvaranja mostova” (engl. bridge amplification) do formiranja gustih nakupina svakog pojedinog fragmenta. Jednolančane nakupine fragmenta se potom sekvenciraju pomoću početnica korištenjem reverzibilne terminacije ugradnje nukleotida. U svakom ciklusu dolazi do ugradnje jednog modificiranog nukleotida s fluoroforom, laserske indukcije fluorofora i bilježenja slike s gornje strane protočne komorice. Po završetku svih ciklusa, fluorescentni signali se kvantificiraju i pretvaraju u zapise nukleotidnih baza (Bentley i sur. 2008). Illumina platforma nudi zasad jedinstvenu mogućnost obostranog sekvenciranja (engl. paired-end, PE) pa time nadoknađuje ograničenje u relativno kratkoj duljini očitavanja od 300 pb (Liu i sur. 2020).

Za razliku od toga, platforma za sekvenciranje Ion Torrent nudi mogućnosti duljih očitavanja (do 400 pb), no sklona je pogreškama pri sekvenciranju homopolimernih dijelova genoma (Salipante i sur. 2014). Ova platforma također upotrebljava sekvenciranje sintezom, međutim princip sekvenciranja je jednostavniji i oslanja se na otpuštanje H<sup>+</sup> iona tijekom sinteze lanca DNA (Rothberg i sur. 2011). Otpuštanje vodikovog iona mijenja pH okolne tekućine što očitava izuzetno mali pH senzor na sloju poluvodiča koji pretvara kemijski signal u električni (Kohn i sur. 2013). Priprema knjižnice koja prethodi sekvenciranju ovdje je nešto kompleksnija jer uključuje i emulzijski PCR tijekom kojeg se individualni fragmenti klonalno amplifiraju na ionskim sferama (Glenn 2011).

Metode NGS mnogo su brže i povoljnije u usporedbi sa Sangerovom metodom sekvenciranja jer omogućavaju sekvenciranje i genotipizaciju velikog broja uzoraka odjednom



(paralelno) te u sebi objedinjuju molekularno kloniranje i sekvenciranje, i to za nižu cijenu (Lighten i sur. 2014; Klasberg i sur. 2019). No, povezane teškoće koje se pojavljuju su stvaranje kimernih sekvenci i drugih artefakata koji su prisutni u reletivno visokoj učestalosti u usporedbi s pravim alelima. Iako se artefakti mogu pojaviti i tijekom standardne lančane reakcije polimerazom (engl. Polymerase chain reaction, PCR) (Lenz i Becker 2008; Stutz i Bolnick 2014), mnogo su češći u NGS metodama sekvenciranja. Stoga je korištenje kombinacije tradicionalnih i novorazvijenih metoda dobra strategija u preliminarnoj genotipizaciji lokusa MHC te omogućuje dosljedne i pouzdane rezultate (Lighten i sur. 2014).

#### 2.1.5. Istraživanja povezanosti gena MHC i parazita

Parazitizam predstavlja odnos između dvije vrste, u kojem nametnička vrsta, parazit, koristi drugu vrstu, nositelja, kao svoje stanište i izvor hranjivih tvari (Dogiel, 1964). U slučajevima kada paraziti izazivaju štetne učinke po svog nositelja, nazivamo ih uzročnicima bolesti ili patogenima (Crofton 1971). Odnos između nositelja i parazita složena je interakcija u kojem su organizmi i ekološko i evolucijski povezani jedni s drugima (Gandon i Michalakis 2002; Olano i sur. 2011). Seleksijski pritisak parazita pokreće genetske prilagodbe nositelja koje nastoje umanjiti mogućnost i posljedice invazije, što zauzvrat prisiljava parazite da se iznova prilagode svojim nositeljima, rezultirajući stalnom koevolucijom. Ukoliko parazit u kratkom vremenskom periodu eliminira određeni genotip nositelja, prijenos parazita će se posljedično smanjiti (Hughes i Nei 1992). Paraziti imaju izrazito visoku stopu evolucije, te se smatraju jednim od najbržih seleksijskih čimbenika s kojima se organizmi nositelja susreću. Stoga je od velike važnosti za populaciju nositelja da može velikom brzinom odgovoriti na novu varijantu parazita (Ebert i Fields 2020).

Zbog svoje uloge u imunološkom odgovoru na patogene, geni MHC pod izravnim su utjecajem selekcije posredovane parazitima (Garrigan i Hedrick 2003). Brojna istraživanja istražila su povezanost alela, odnosno MHC varijabilnosti u odnosu na podložnost parazitima. U eksperimentalnim uvjetima u laboratoriju ili na divljim populacijama u istraživanjima je pokušano empirijski potvrditi djelovanje seleksijskih mehanizama „heterozigotne prednosti“ i „selekcije ovisne o učestalosti“.

Istraživanja Eizaguirre i sur. (2012) i Phillips i sur. (2018) pružila su dokaze za brze adaptivne evolucijske promjene u genima MHC kralježnjaka koje su uzrokovane selekcijom posredovanom parazitima. Phillips i sur. u svom eksperimentalni modelu invadirali su gupije (*Poecilia reticulata*) čestim ektoparazitom *Gyrodactylus turnbulli*. Utvrdili su da su novi aleli

i supertipovi (koji ranije nisu bili u kontaktu s parazitom) donijeli značajnu otpornost gupijima te su tako dokazali mehanizam selekcije ovisne o učestalosti, no nisu našli dokaze heterozigotne prednosti. Eizaguirre i sur. (2012) dokumentirali su brzu promjenu učestalosti alela MHC kod riba koljuški kao odgovor na izloženost parazitima. U laboratorijskim uvjetima izložili su roditeljske generacije parazita (oblici *Anguillicoloides crassus* i *Camallanus lacustris*). Već u drugoj generaciji povećala se učestalost dva haplotipa: 19.7% onog koji je nosio otpornost na *C. laustris*, a 15.5% onog za otpornost na *A. crassus*. Također, druga generacija bila je znatno otpornija na invazije nego roditeljska generacija.

Povezanost određenih alela i otpornosti na parazite utvrđena je među ostalim i u istraživanjima Paterson i sur. (1998) u populacije divljih ovaca (*Ovis aries*), Axtner i Sommer (2012) u vrste miša *Apodemus flavicollis* i u istraživanju Kloch i sur. (2013) na voluharicama *Microtus oeconomus*, no autori su utvrdili i određene alele koji su povezani s većom podložnošću invaziji. Moguće objašnjenje je u pleomorfizmu alela, odnosno međudjelovanju različitih parazita na lokuse MHC što rezultira time da određeni aleli imaju zaštitnu ulogu protiv određenog parazita, ali nose podložnost prema drugom (Sepil i sur. 2013). U istraživanju Westerdahl i sur. (2012) utvrđena je pozitivna korelacija određenih alela MHC kod velikog trstenjaka (*Acrocephalus arundinaceus*) i invazije uzročnikom ptičje malarije iz roda *Plasmodium*, no primijećeno je da je pritom invazija vrlo blaga, odnosno da je broj parazita manji nego kod invadiranih jedinki s drugim genotipovima. Selekcija potencijalno zadržava ove alele u populaciji iako su povezani s podložnošću, jer je stopa preživljavanja uz njih vrlo visoka te doprinose održavanju ravnoteže između nositelja i parazita (Sepil i sur. 2013). Buczek i sur. (2016) u svom istraživanju na populaciji običnog jelena (*Cervus elaphus*) također su utvrdili povezanost gena MHC i podložnosti/otpornosti na parazite. Pritom su podijelili alele lokusa DRB na funkcionalne skupine – supertipove, te provjerili povezanost pojedinih supertipova i invazije.

Pokazalo se da je teže utvrditi povezanost raznolikosti MHC pojedine jedinke, odnosno heterozigotnosti, s otpornošću na parazite jer nije uvijek jasno favorizira li selekcija u određenom primjeru heterozigotnost ili specifični alel prisutan u heterozigotnom genotipu (Spurgin i Richardson 2010; Radwan i sur. 2020). Froeschke i Sommer (2005) utvrdili su da homozigoti miša *Rhabdomys pumilio* za lokus MHC imaju značajno veći fekalni broj jajašaca raznih parazitskih vrsta, ali i općenitu prevalenciju parazita. Isto tako, i u istraživanju Lenz i sur. (2009) heterozigotnost (broj različitih alela na lokusu) i veća divergencija alela, odnosno veći prosječni broj aminokiselinskih razlika između alela, bio je u pozitivnoj korelaciji s

fizičkim stanjem kod štakora *Leopoldamys sabanus* i u negativnoj korelaciji s fekalnim brojem jajašaca parazitskih vrsta.

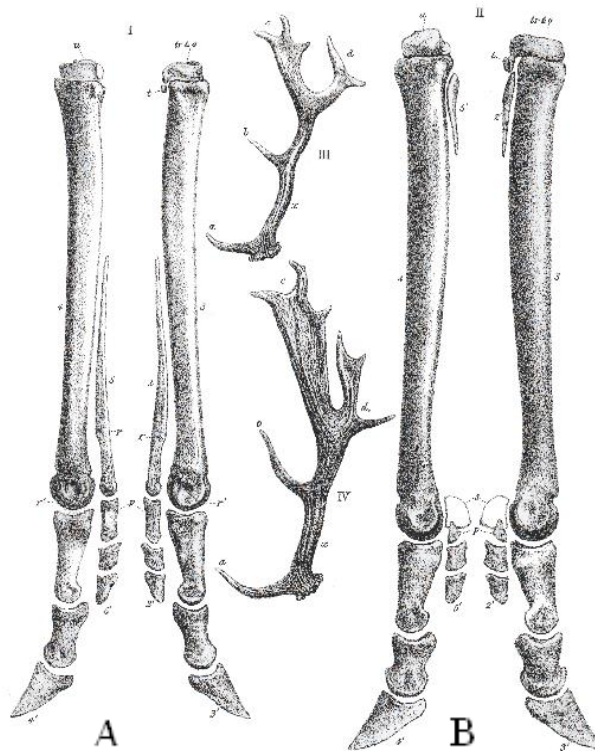
Ispitivanje utjecaja raznolikosti MHC na otpornost na novog parazita u prirodnim uvjetima izvan laboratorija predstavlja veći izazov. Očekivano je da će se potencijalne prilagodbe nositelja na novog parazita moći otkriti pretežno kod nositelja s vrlo kratkim generacijskim vremenom. Ipak, nalazi Konjevića i sur. (2017, 2021) ukazuju na to da se ove prilagodbe mogu pojaviti vrlo brzo na patološkoj i epidemiološkoj razini i kod većih nositelja kao što su srna i divlja svinja, sa znatno duljim generacijskim vremenom. S obzirom na sposobnost brze evolucije gena MHC, vrlo je vjerojatno da bi se takve promjene mogle odraziti i na toj genskoj regiji, ponajviše u vidu korelacije specifičnih alela, odnosno njihove učestalosti, s invazijom novog parazita.

## 2.2. Obična srna (*Capreolus capreolus*)

Obična srna (*Capreolus capreolus* L.) pripada u red parnoprstaša (Artiodactyla), preživača (Ruminantia) i porodicu jelena (Cervidae) (tablica 1). Prema značajkama kostiju, kao što su izgled metakarpalnih kosti (slika 3) i nosno-ždrijelnih otvora, svrstavamo je u potporodicu nepravih jelena (Telemetacarpalia) (Brooke 1878).

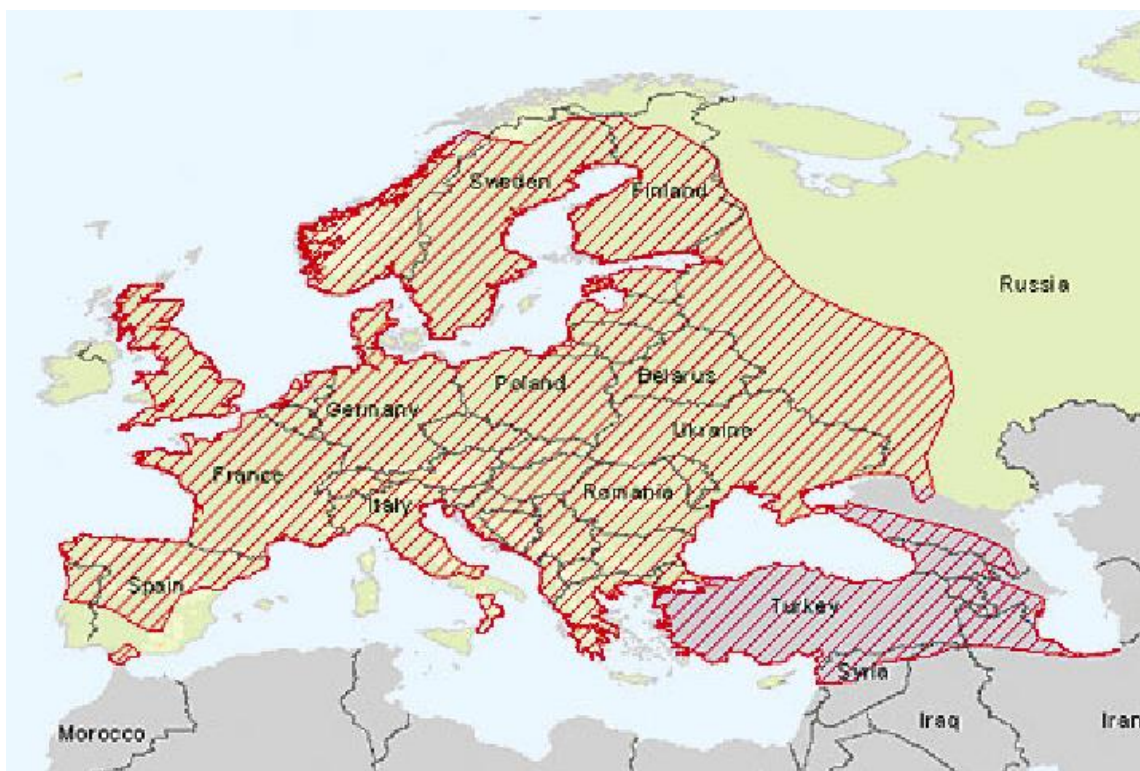
Tablica 1. Sistematika obične srne

<b>Carstvo</b>	Životinje (Animalia)
<b>Koljeno</b>	Svitkovci (Chordata)
<b>Razred</b>	Sisavci (Mamalia)
<b>Red</b>	Parnoprstaši (Artiodactyla)
<b>Podred</b>	Preživači (Ruminantia)
<b>Porodica</b>	Jeleni (Cervidae)
<b>Potporodica</b>	Nepravi jeleni (Telemetacarpalia)
<b>Rod</b>	Srna ( <i>Capreolus</i> )
<b>Vrsta</b>	Obična srna ( <i>Capreolus capreolus</i> Linnaeus, 1758.)



Slika 3. Metakarpalne kosti nepravih jelena (A) i pravih jelena (B) (preuzeto iz Brooke,1878).

Rasprostranjena je čitavim područjem Europe, s izuzetkom Islanda, Irske, sjevera Skandinavije i sredozemnih otoka. Istočna granica rasprostranjenosti obuhvaća zapadnu Rusiju, Kavkaz, sjeverni Iran i Irak (Danilkin 1995) (slika 4). Osim obične srne, na jugu europskog dijela Rusije obitava i sibirski srna (*Capreolus pygargus*) (Pallas, 1771) koja je veća od obične. Područje rasprostranjenosti ovih vrsta poklapa se u porječju rijeka Don i Volge (Kashinina i sur. 2018).



Slika 4. Rasprostranjenost obične srne (*Capreolus capreolus*) (preuzeto iz Burbaité i Csányi , 2010).

U prvoj polovici 20. stoljeća u pojedinim dijelovima Europe, obična srna gotovo je izumrla zbog gubitka staništa i prekomjernog lova. Vrsta se otada oporavila i u porastu je u posljednjih 20-40 godina zbog napuštanja poljoprivrednih zemljišta, poboljšanog lovnog gospodarenja i reintrodukcija te je danas prema IUCN-u svrstana pod “najmanje zabrinjavajuću vrstu” (engl. least concern, LC) (Lovari i sur. 2016). U većini područja obična srna ekonomski je važna lovna vrsta, te je u prošlosti bilo više introdukcija s ciljem povećavanja brojnosti lokalnih populacija (Baker i Rus Hoelzel 2013; Apollonio i sur. 2017; Plis i sur. 2022). Filogenetska i filogeografska istraživanja korištenjem mitohondrijske DNA europske obične srne pokazala su jasnu podjelu na tri mitohondrijska ogranka: istočni, zapadni i središnji (Randi i sur. 2004; Plis i sur. 2022). Sva tri ogranka pokazala su veliku haplotipsku raznolikost i relativno nisku nukleotidnu raznolikost (Plis i sur. 2022). Središnji ogranak, kojem pripada i hrvatska populacija srna, najrasprostranjeniji je te ga nalazimo od Portugala i Španjolske, preko Velike Britanije sve to Skandinavskog poluotoka na sjeveru i obala Crnog mora na istoku (Plis i sur. 2022).

Na teritoriju Republike Hrvatske običnu srnu nalazimo gotovo posvuda, a brojnost ove vrste bila je posebice velika u kontinentalnom području (Slavonija, Baranja, Gorski kotar). Uz

divlju svinju (*Sus scrofa*), najmnogobrojniji je predstavnik krupne divljači u Hrvatskoj (Janicki i sur. 2007). U posljednjem desetljeću, međutim, populacija obične srne drastično se smanjila na područjima Slavonije, Baranje i Posavine. Više čimbenika, uključujući nepravilno lovno gospodarenje, vjerojatno je pogodovalo ovom smanjenju, no porast invazije velikim američkim metiljem ističe se kao jedan od najvažnijih.

Obična srna oportunistička je vrsta po pitanju staništa koja najčešće obitava u šumama s gustim podrastom, na livadama ili poljima s grmljem (Janicki i sur. 2007; Apollonio i sur. 2010). Aktivna je danju i noću, najviše se hrani u sumrak. Prehrana se sastoji od raznih vrsta trave, zeljastih biljaka, lišća, sjemenki, gljiva, bobica i žitarica. Srna je teritorijalna vrsta, odnosno većinu životnog vijeka provede na relativno malom prostoru promjera oko 10 km kojeg nerado napušta. Prilagodljiva je, pa ju nalazimo i na staništima kao što su monokulture i neobrađena polja. Na takvim staništima se srne ponekad okupljaju u veća krda što inače nije karakteristično za vrstu, a takve skupine nazivaju se nagomilana krda. S druge strane, uobičajeno je da se srne okupljaju u manja krda u zimskom periodu kako bi lakše prevladale nepovoljne uvjete (Janicki i sur. 2007).



Slika 5. Ženka srna i mužjak srnjak (preuzeto iz <https://www.rewildingbritain.org.uk>).



Boja krzna varira od crvenosmeđe ljeti do sivosmeđe zimi. Rogovlje je manje veličine, s u pravilu 6 parožaka, iznimno i više. Mužjak (srnjak) ima rogove, dok ženka (srna) uglavnom nema (slika 5). U nekim slučajevima, kao što su primjerice jalovost, starost ili bolesti jajnika, kod ženki se također mogu pojaviti manji rogovi. Kao i svi punorošci, i srnjaci svake godine odbacuju staro rogovlje te im izrasta novo, obično u mjesecu studenom. Raspon tjelesne mase srna je od 15 do 27 kg, visina u grebenu dosiže oko 75 cm, dok je duljina od njuške do korijena repa 130-140 cm. Ženke su u pravilu manje i lakše od mužjaka (Janicki i sur. 2007).

Srne prema ponašanju možemo svrstati u distancijalni tip, što podrazumijeva da se rijetko udružuju u veća krda. Općenito se srne grupiraju u tri tipa skupina, porodično krdo, koje čine majka i lanad, prošireno porodično krdo kada se majci i lanadi pridružuje i lanad iz prethodne godine, te nagomilano krdo koje čini veći broj jedinki (i više od deset).

Vrijeme parenja je od srpnja do kolovoza. Mužjaci zauzimaju vlastite teritorije koje brane od drugih mužjaka i dočekuju ženke. Nakon parenja, ženka nosi mlado čak 285-290 dana zahvaljujući embrioteniji, odnosno usporenom razvitku ploda. Embriotenija omogućava da mlado, koje se naziva lane (slika 6), na svijet dođe u svibnju ili lipnju, odnosno u vrijeme kad nastupe optimalni uvjeti za njegov razvoj. Spolna zrelost nastupa nakon 14 mjeseci. Životni vijek je obično 13-15 godina (Janicki i sur. 2007).



Slika 6. Lane i ženka obične srne (preuzeto iz <https://www.rewildingbritain.org.uk>).



### 2.2.1. Bolesti i nametnici obične srne

Srne su podložne vanjskim i unutarnjim nametnicima. Od vanjskih su značajni krpelji i iz reda muha jelenska uš (*Lipoptena cervi*), a od unutarnjih razni crijevni nametnici, metilji i plućni vlasci. Kožni i nosni štrkovi također se razmjerno često pojavljuju kod srna. Od zaraznih bolesti u svakodnevnim uvjetima pojavljuju se papilomatoze i fibromatoze, koje se u novije vrijeme klasificiraju kao fibropapilomatoze, te ponekad infekcije s bakterijom *Escherichia coli*. Rijetko se može pojaviti bjesnoća i bedrenica. U današnje vrijeme česta su i kronična trovanja kemijskim sredstvima kao što su primjerice pesticidi, koja imaju trajne posljedice na organe i organske sustave. Najvažniji grabežljivci za srne su vukovi, psi bez nadzora, lisice i kune zlatice, a za lanad su opasne i sove ušare, lasice i divlje mačke (Janicki i sur. 2007).

U istraživanju parazitske faune s područja Hrvatske Richter i sur. (1959) utvrdili su 32 vrste parazita, od kojih je najčešći bio oblič *Chabertia ovina*. Od ostalih oblića utvrđeni su *Trichostrongylus colubriformis*, *Trichostrongylus extenuatus*, *Gongylonema pulchurum*, *Oesophagostomum venulosum*, *Oesophagostomum radiatum*, *Ostertagia ostertagi*, *Ostertagia circumcincta*, *Haemonchus contortus*, *Nematodirus* sp., *Dictyocaulus viviparus*, *Trichuris ovis*, *Setaria labiato papillosa* i *Capillaria* sp. Zabilježena je i pojava metilja *Fasciola hepatica*, *Paramphistomum cervi* i *Dicrocoelium lanceolatum (dendriticum)* te trakavica *Taenia solium*, *Taenia hydatigena* i *Moniezia benedeni*. Hubert i Štahan (1983) utvrdili su pet različitih vrsta oblića u 12 srna s područja Samoborskog gorja. Kusak i sur. (2012) istražili su zdravstveni status 25 srna iz Gorskog kotara, među kojima je utvrđeno 12 različitih vrsta parazita. Najveću učestalost i ovdje je imala vrsta *Chabertia ovina* (36%), a slijedile su vrste roda *Ostertagia* (24%) i *Trychonstrongylus* (20%).

U istraživanju Bujanić i sur. (2016) analizirano je 38 uzoraka probavnog sustava srne s područja kontinentalne Hrvatske (Zagrebačka županije, Medvednica i Bjelovarsko-bilogorska županija). Utvrđena je visoka prevalencija vrsta roda *Trychonstrongylus* (87%), a redom su slijedile vrste *Eimeria* sp., *Setaria* sp., veliki i mali plućni vlasci, *Trichuris* sp., *Giardia* sp., *Haemonchus* sp. te *Fascioloides magna*. U diplomskom radu Sabol (2018) zabilježena je invadiranost 83,3% srna probavnim parazitima. Utvrđeno je 8 vrsta oblića i jedna vrsta trakavice, a veću invadiranost imali su mužjaci u odnosu na ženke. Konačno, Čurlík i sur. (2019) su identificirali po prvi puta u Hrvatskoj vrstu *Setaria tundra*, te doveli u pitanje prethodnu identifikaciju vrste *Setaria labiatopapillosa*.

### 2.2.2. Istraživanja gena MHC u srna i drugih vrsta porodice jelena (Cervidae)

Iako je srna jedan od najrasprostranjenijih pripadnika reda parnoprstaša u Europi, (Andersen 2000), istraživanja varijabilnosti gena MHC ove vrste još su uvijek prilično oskudna, a istraživane populacije geografski vrlo udaljene. Mikko i sur. (1999) istražili su polimorfizam lokusa DRB u srna iz Švedske i Norveške. Izvijestili su o ograničenim razinama polimorfizma u odnosu na druge vrste divljih preživača. Nadalje, pronašli su dokaze samo o jednom lokusu DRB, ali su prepoznali čest slučaj delecije kodona u alelima, što otežava proces genotipizacije. Quéméré i sur. (2015) istražili su urođeni i stečeni imunitet u tri populacije srna iz Francuske, s obzirom na raznolikost staništa na kojem obitavaju. Potvrdili su postojanje povijesne i sadašnje selekcije koja djeluje na gene uključene u prepoznavanje uzročnika bolesti, uključujući lokus DRB gena MHC. Nadalje, naglasili su ključnu ulogu ovih gena u koevolucijskoj dinamici između srna i potencijalnih uzročnika bolesti te su utvrdili veću razinu varijabilnosti nego u prethodnom istraživanju. Bužan i sur. (2022) usporedili su varijabilnost adaptivnog lokusa DRB s neutralnim mikrosatelitnim lokusima kod populacije obične srne iz Slovenije. Genetička struktura zamijećena na mikrosatelitnim lokusima nije se reflektirala na gene MHC te nisu nađeni dokazi lokalne adaptacije na razini gena MHC. Dokumentirali su srednje vrijednosti raznolikosti i nisu utvrdili povećanu heterozigotnost.

Nasuprot jednom identificiranom lokusu DRB kod obične srne, kod običnog jelena lokus DRB je multipliciran. Dosadašnja istraživanja potvrdila su postojanje od jednog do četiri lokusa DRB (Swarbrick i sur. 1995; Swarbrick i Crawford 1997; Fernández-de-Mera i sur. 2009; Buczek i sur. 2016; Pérez-Espona i sur. 2019; Bujanić i sur. 2020). Varijabilnost lokusa također je oscilirala ovisno o populaciji; od niže varijabilnosti uočene u istraživanjima na španjolskoj (Fernández-de-Mera i sur. 2009) i poljskoj (Buczek i sur. 2016) populaciji do visoke varijabilnosti u populaciji jelena iz Hrvatske (Bujanić i sur. 2020). Dosad je potvrđeno da izuzev običnog jelena, u porodici Cervidae više od jednog lokusa DRB imaju jelen lopatar (*Dama dama*) (Mikko i sur. 1999) i Ussuri sika jelen (*Cervus niponicus hortulorum*) (Li i sur. 2013). Ellegren i sur. (1996) posvjedočili su nižim razinama varijabilnosti gena MHC skupine I i II u populaciji europskog losa (*Alces alces*) u Švedskoj, što su pripisali selekcijskom pritisku u dalekoj prošlosti ili solitarnom načinu života losova zbog kojeg teže dolazi do prijenosa uzročnika bolesti. Istraživanjem na bjelorepom jelenu (*Odocoileus virginianus*), Ditchkoff i sur. (2001) potvrdili su prijašnju hipotezu Van Den Bussche i sur. (1999) da ova vrsta ima samo jedan lokus DRB. Pronašli su 12 alela u 128 jedinki te su primjetili da se prema aminokiselinskom sastavu aleli dijele u dvije linije. Kennedy i sur. (2011) pronašli su 25 alela

na lokusu DRB u 114 jedinki karibua (*Rangifer tarandus*) i zaključili da su razine genetičke varijabilnosti ove populacije relativno visoke. Nasuprot tomu, Taylor i sur. (2012) istražili su varijabilnost gena MHC kod ugrožene podvrste karibua *Rangifer tarandus pearyi* koji nastanjuje sjeverozapad Kanade, te su utvrdili višak homozigota i smanjenu varijabilnost. U usporedbi s tim rezultatima, lokus DRB u Ussuri sika jelena (*Cervus nipon hortulorum*) pokazao je relativno visoke razine varijabilnosti (Li i sur. 2013). Autori su naglasili sličnost pronađenih alela i dosad opisanih alela kod vrsta roda *Cervus*, što je dokaz transspecijskog polimorfizma karakterističnog za gene MHC.

### **2.3. Veliki američki metilj (*Fascioloides magna*)**

#### 2.3.1. Sistematika i morfološke značajke

Veliki američki metilj (*Fascioloides magna*) pripada potkoljenu plošnjaci (Platyhelminthes), razredu metilji (Trematoda) i podrazredu dvorodni metilji (Digenea) (tablica 2). Dvorodni metilji su obligatni paraziti, a njihov životni ciklus uključuje najmanje dva nositelja (posrednika i konačnog nositelja) te dva ili više infektivna stadija. Posjeduju brojne prilagodbe koje im omogućavaju nametnički način života kao što su različite vrste prijanjalki (siski), vanjski pokrovni sloj, adhezivne žlijezde na pokrovnom sloju, specifični razvojni stadiji u životnom ciklusu i brojno potomstvo (Habdija i sur. 2011).

Tablica 2. Sistematika velikog američkog metilja.

<b>Carstvo</b>	Životinje (Animalia)
<b>Koljeno</b>	Acelomata (Acoelomata)
<b>Potkoljeno</b>	Plošnjaci (Platyhelminthes)
<b>Razred</b>	Metilji (Trematoda)
<b>Podrazred</b>	Dvorodni metilji (Digenea)
<b>Red</b>	Echinostomida
<b>Nadporodica</b>	Echinostomatoidea
<b>Porodica</b>	Fasciolidae
<b>Podporodica</b>	Fasciolinae
<b>Rod</b>	<i>Fascioloides</i>
<b>Vrsta</b>	Veliki američki metilj ( <i>Fascioloides magna</i> Bassi 1875)

Veliki američki metilj prvi put je opisao talijanski veterinar Roberto Bassi u Italiji 1875. godine pod nazivom *Distomium magnum* (Bassi 1875). No, Stiles i Hassal (1894) su objavili potpuni morfološki opis odraslog metilja i dali mu naziv *Fascioloides magna* koji se i danas koristi. Henry B. Ward dokumentirao je razlike između *F. magna* i drugih vrsta iz roda *Fasciola* te je predložio osnivanje novog roda *Fascioloides* s jedinim predstavnikom, metiljem *F. magna* (Ward 1917).

Veliki američki metilj doseže duljinu 8-10 cm što ga čini jednim od najvećih metilja. Tijelo mu je spoljoštено dorzoventralno i ovalno (slika 7) te pokriveno netrepetljivim, sincicijalnim slojem koji se naziva neoderma ili tegument. Tegument omogućava zaštitu, izmjenu tvari i plinova te potpomaže apsorpciju glukoze i nekih aminokiselina. Na tijelu ima

dvije prijanjalke, usnu (oralnu) i trbušnu (ventralnu) koje mu omogućavaju pričvršćivanje na nositelja. Živčani sustav u metilja sastoji se od glavnih (cerebralnih) ganglija koji se nalaze na prednjem dijelu tijela iznad ždrijela te šest radijalno raspoređenih živčanih vrpca koje se spuštaju prema stražnjem dijelu tijela, a međusobno su povezani poprečnim živčanim vlaknima (Erhardova-Kotrla 1971; Habdija i sur. 2011). Funkciju ekskrecije i osmoregulacije obavlja protonefridijalni sustav. On se sastoji od ekskretornih pora i kanalića (nefridiodukta) koji odvođe vodu i višak metabolita do mokraćnog mjehura na stražnjem dijelu tijela koji se prazni kroz nefridiopor. Probavilo je neprohodno (aproktno), bez crijevnog otvora. Započinje usnim otvorom na prednjem dijelu tijela na koje se nastavlja mišićno ždrijelo, jednako te razgranato slijepo crijevo s epitelom (gastrodermis). Hranu osim ustima metilji uzimaju i apsorbiraju preko površine tijela (Habdija i sur. 2011).

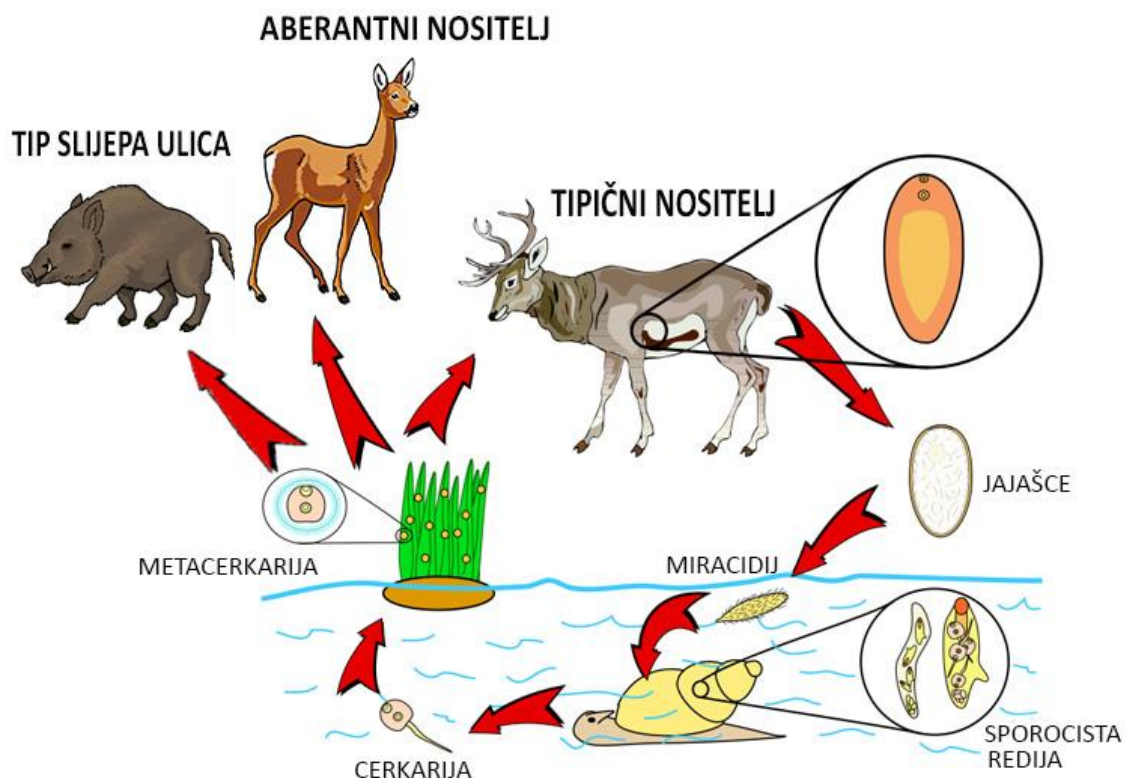
Kao i većina metilja, i pripadnici ove vrste su dvospolci što podrazumijeva razvoj muškog i ženskog spolnog sustava unutar iste jedinice. Muški spolni organi sastoje se od dva sjemenika, sjemenovoda te cirusne vrećice unutar koje se nalaze sjemeni mjehurić, prostatična žlijezda i kopulatorni organ cirus. Ženski spolni organi započinju jajnikom na koji se nastavlja jajovod koji vodi do ootipa. U ootip se otvaraju Mehlijeve žlijezde koje sudjeluju u stvaranju jajne ovojnice. U postranom dijelu tijela nalaze se žumanjčišta (vitelariji) koja proizvode žumanjčane stanice (vitelocite) koje se ulijevaju u ootip i također imaju ulogu u stvaranju jajne ovojnice. Na ootip se nastavlja plodnica (uterus) koja se nastavlja prema spolnom atriju i zajedničkom muškom i ženskom spolnom otvoru (Habdija i sur. 2011; Králová-Hromadová i sur. 2016).



Slika 7. Odrasli stadij velikog američkog metilja (*Facioloides magna*) (preuzeto iz Malcicka i sur. 2015).

### 2.3.2. Životni ciklus

Veliki američki metilj, kao i drugi pripadnici skupine dvorodnih metilja, za potpuni životni ciklus treba posrednika i tipičnog konačnog nositelja. Posrednik je slatkovodni puž iz roda *Galba* (Lymnaeidae) (Erhardova-Kotrla 1971). Konačni nositelji mogu biti tipični (npr. obični jelen, jelen lopatar), aberantni (npr. ovca, muflon, srna obična) ili tip „slijepa ulica“ (npr. los, goveda, konj, divlja svinja). I aberantni i nositelj tipa slijepa ulica u većini slučajeva predstavljaju kraj životnog ciklusa metilja, jer kod ovih nositelja metilj ne izbacuje jajašca u okoliš (Králová-Hromadová i sur. 2016). Aberantni nositelji imaju najnepovoljniji tijek invazije jer juvenilni metilj nastavlja s migracijom kroz parenhim jetre, uslijed čega nastaju teška oštećenja tkiva, jaka krvarenja i smrt životinje (Králová-Hromadová i sur. 2016). Kod nositelja tipa „slijepa ulica“ metilj se začahuri u pseudocistu izrazito debelih stijenki iz koje ne izlučuje jajašca i s vremenom ugiba (Konjević i sur. 2017). Kod tipičnog nositelja odrasli metilj se začahuri u jetri okružen tankom fibroznom pseudocistom koja dnevno izlučuje i do 4000 jajašaca (Swales 1935). Jajašca se u toplom i vlažnom okolišu razvijaju u trepetljikavu ličinku–miracidij. Miracidij luči proteolitičke enzime koji razgrađuju ovojnici jajašca i omogućuju izlijevanje (Pybus 2001). Nakon izlijevanja, miracidij aktivno pliva u potrazi za slatkovodnim pužem (posrednikom) služeći se pozitivnom fototaksijom i kemotaksijom (kemokinezom). Nakon pronalaska puža, miracidij penetrira kroz kožu puža i metamorfozira u sporocistu (Malcicka 2015). Sporocista sadrži zametne stanice koje se razvijaju u majku rediju i potom u kćer redije iz kojih se stvaraju cercarije. Cercarije posjeduju probavni sustav, rep i prijanjalke te napuštaju puža. Nakon napuštanja puža, cercarije se vraćaju u vodu, kratko putuju pa se pričvrste za vodeno bilje gdje se začahure i pretvaraju u metacercarije (Erhardova-Kotrla 1971). Uslijed ingestije vodene vegetacije na koju su metacercarije pričvršćene, metacercarije dopijevaju u probavni sustav konačnih nositelja. Nakon ingestije metacercarije buše stijenkicu crijeva nositelja i migriraju do jetre u kojoj susreću druge metilje i razvijaju se u odrasle jedinke. Aktivacijom imunskog sustava nositelja oko metilja se stvara pseudocista iz koje se u konačnici ipak luče jajašca. Pseudocista najčešće sadržava dva ili više odraslih metilja (Pybus 2001) (slika 8).



Slika 8. Životni ciklus velikog američkog metilja (preuzeto i prilagođeno s <https://parasitology.cvm.ncsu.edu/>)

### 2.3.3. Patološke i epidemiološke značajke

Klinička slika i ishod fascioloidoze ponajviše ovise o tipu konačnog nositelja. Kod tipičnih nositelja uglavnom nema izraženijih kliničkih znakova no ponekad ipak može doći i do uginuća uslijed teškog oblika invazije (Pursglove i sur. 1977; Balbo i sur. 1987). Kod pregleda jetre tipičnog nositelja, obično su vidljivi znaci povećane jetre nepravilne površine, naslage fibrina, gubitak prozirnosti Glissonove kapsule te tragovi tamnog pigmenta željezo-porfirina (slika 9). Tamni pigment nastaje u probavilu metilja kao nusprodukt razgradnje krvi i specifičan za je za invaziju velikim američkim metiljem (Campbell 1960). Osim na površini jetre, tamni pigment je vidljiv i na njenom presjeku i na unutrašnjosti trbušne šupljine. Na tkivu jetre obično su vidljive i lezije u obliku kanala nastale zbog migracije mladih metilja. Općenito, metilje u jetri može se podijeliti na mlade i odrasle, spolno zrele. Razlikuju se već na prvi pogled jer su odrasle jedinke žućkaste boje koja potječe od jajašca. Jetra je kod tipičnih nositelja



povećana zbog pseudocista u kojima su inkapsulirani odrasli metilji (slika 10), a koje nastaju zbog imunskog odgovora nositelja. Pseudociste nastaju nakon zaustavljanja migracije metilja, ali i omogućuju optimalne uvjete za njegov daljnji razvoj i razmnožavanje. Unutrašnjost pseudocista ispunjena je smeđom mukoznom tekućinom i sadrži najčešće dva odrasla metilja (Králová-Hromadová i sur. 2016). Žučovodima su pseudociste povezane s tankim crijevom, a tim putem i jajašca metilja dopijevaju u okoliš (Pybus 2001). Pseudociste su obično veličine do 5 cm u promjeru, ali ponekad mogu biti i veće (do veličine ljudske šake), što je obično posljedica prekida komunikacije sa žučovodima. U upalnom filtratu koji se nalazi u okolici pseudociste prevladavaju limfoplazmoci nad neutrofilima i eozinofilima.



Slika 9. Invadirana jetra srne s tragovima željezo-porfirina i brojnim pseudocistama

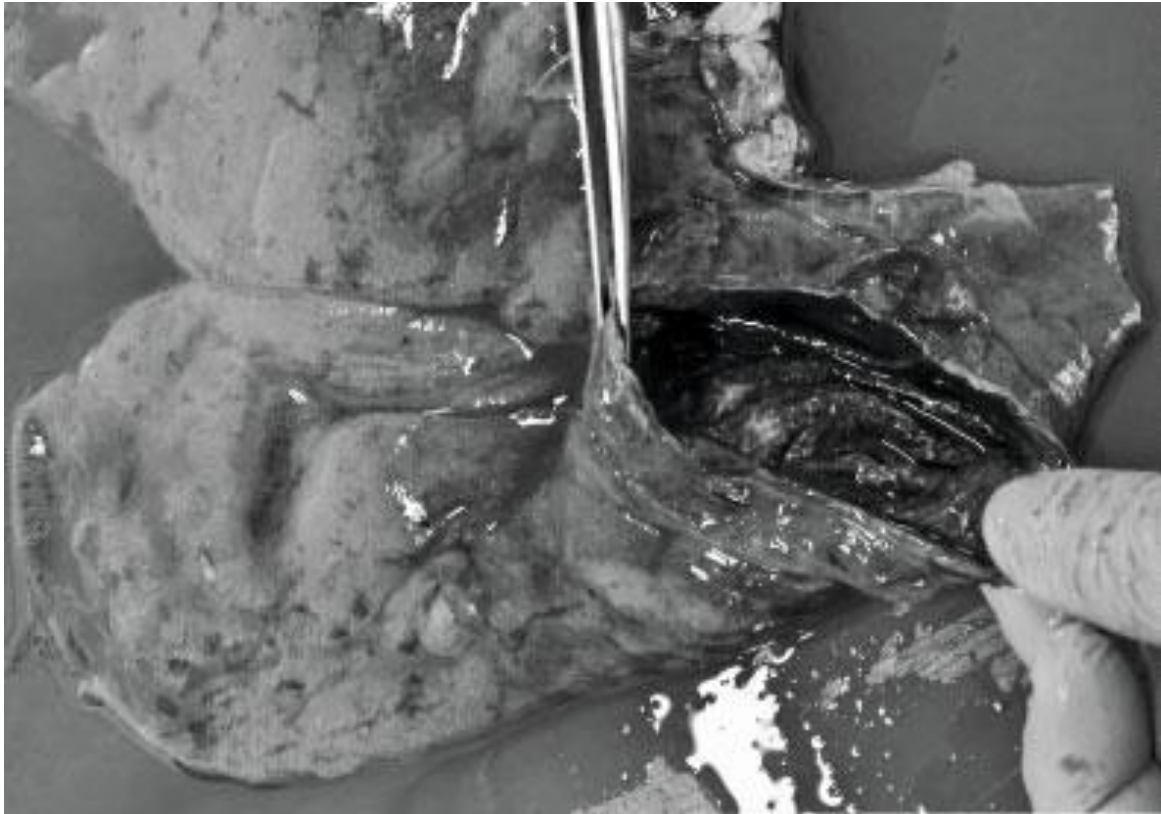




Slika 10. Poprečni presjek invadirane jetre s vidljivim oštećenjima, tragovima željezo-porfirina, pseudocistama, ožiljnim tkivom i migratornim putevima

Kod nositelja tipa „slijepa ulica“ kao što je divlja svinja na jetrenom parenhimu vidljive su lezije, tragovi željezo-porfirina, naslage fibrina i nalazi pseudocista s debelim stijenkama. Pseudociste debelih stijenki zaustavljaju migraciju metilja jetrenim parenhimom i metilj potom nije u mogućnosti proizvesti funkcionalna jajašca te najčešće ugiba. Zbog toga nositelji tipa „slijepa ulica“ dosad imaju zaštitničku ulogu svojevrsnog čistača okoliša. Međutim, Konjević i sur (2017) zabilježili su pronalazak i pseudocista s tankim stijenkama i jajašcima kod divljih svinja (slika 11). Tanke stijenke omogućavaju razvoj veza između pseudocista i žučovoda čime se pseudociste opskrbljuju hranjivim tvarima, što bi u budućnosti moglo osigurati dulje preživljavanje metilja kod divljih svinja te dovršetak životnog ciklusa uz lučenje jajašca u okoliš. S obzirom na veličinu populacije divljih svinja, kao i dinamiku njihove migracije, ova

prilagodba mogla bi dovesti do još bržeg i efikasnijeg širenja fascioloidoze (Konjević i sur. 2017).



Slika 11. Nekarakteristično tanke pseudociste s dva odrasla metilja pronađene kod divlje svinje (preuzeto iz Konjević i sur. 2017).

Kod aberantnih nositelja, kao što je primjerice obična srna, invadirana jetra je uglavnom teško oštećena, puna lezija i izraženih krvarenja (slika 12). Izvana je jetra nepravilnog oblika i ponekad poprima izgled velikog hematoma (Konjević i sur. 2019). Teška oštećenja tkiva često su vidljiva i na plućima i slezeni čak i kod invazije slabog intenziteta. Aberantni nositelji uglavnom imaju snažan imunski odgovor na metilja, ali ne uspijevaju ograditi metilja pseudocistom i time zaustaviti njegovu migraciju kroz jetreni parenhim. Neprekinuta migracija uzorkuje jake upalne reakcije, oštećenje jetre, krvarenje (slika 13) i posljedično uginuće jedinke. Kod aberantnih nositelja može doći i do pogrešne orijentacije metilja tijekom njegove migracije trbušnom šupljinom što dovodi do prodiranja u druge organe kao što su su pluća ili slezena (Bujanić i sur. 2019; Stiles i sur. 2021). S obzirom da metilj kod invadiranih aberantnih

nositelja nije u mogućnosti producirati jajašca u okoliš, on ne može ni završiti svoj životni ciklus. Stoga tijekom invazije kod aberantnih nositelja ima negativan ishod kako za metilja tako i za njegovog nositelja. Ipak, Demiaszkiewicz i sur. (2018) utvrdili su nalaz pet funkcionalnih pseudocista u jetrima jedinke obične srne. Nadalje, Konjević i sur. (2021) su utvrdili pseudociste u sedam običnih srna uz znakove reinvazije što upućuje na produženu (kroničnu) invaziju kod aberantnih nositelja i mogućnost nastanka funkcionalnih prilagodbi na parazita. U najnovijim istraživanjima Filip-Hutsch i sur. (2022) zabilježili su i pojavu jajašaca *F. magna* u izmetu srna.



Slika 12. Invadirana jetra srne. Vidljiva je nepravilna površina, замуćenje Glissonove kapsule, tragovi tamnog pigmenta i hemoragija (preuzeto iz Konjević i sur. 2021)





Slika 13. Presjek invadirane jetre srne s migratornim putevima metilja i teškim krvarenjima (preuzeto iz Konjević i sur. 2021)

#### 2.3.4. Geografska rasprostranjenost

Veliki američki metilj prirodno je rasprostranjen na teritoriju Sjedinjenih Američkih Država i na jugu Kanade gdje invadira velik broj različitih domaćih i divljih preživača (Pybus 2001). Održavanju populacije najviše pridonose konačni nositelji bjelorepi jelen (*Odocoileus virginianus*), waipiti jelen (*Cervus canadensis*) i karibu (*Rangifer tarandus*) (Králová-Hromadová i sur. 2011). Trenutno je lokaliziran na 5 glavnih enzootskih područja: (1) Regija Velikih jezera; (2) Obala Meksičkog zaljeva, donji Mississippi i južna obala Atlantskog oceana; (3) sjeverna obala Tihog oceana; (4) Zaravan Stjenjaka i (5) sjeverni Quebec i Labrador (slika 14). Prisutnost i gustoća populacija metilja variraju u ovim područjima.



Slika 14. Područja stalnog žarišta velikog američkog metilja u Sjevernoj Americi (preuzeto iz Malcicka i sur. 2015)

Prvi unos velikog američkog metilja iz zavičajne Sjeverne Amerike u Europu dogodio se 1865. godine i dobro je dokumentiran (Bassi 1875). Po nalogu kralja Vittorija Emanuela II. nekoliko desetaka waipiti jelena uvezeno je iz Sjeverne Amerike u park La Mandria u Italiji, a koji su bili invadirani velikim američkim metiljem. Širenje ostatkom Europe bilo je onemogućeno zbog ograđenosti prostora parka La Mandria, a enzoosko područje bilo je ograničeno na Italiju. Sredinom 20.stoljeća, kao posljedica novih unosa, dolazi do povećanja slučajeva invazije u drugim dijelovima Europe, pa su stalnim žarištima fascioloidoze proglašena i područja Češke (Erhardova-Kotrla 1971) i dolina toka rijeke Dunav u Slovačkoj (Rajský i sur. 1994), Mađarskoj i Austriji (Pfeiffer 1983). (slika 15). Pretpostavka da se unos velikog američkog metilja u Europu ponovio nekoliko puta potvrđena je molekularnim istraživanjem Králová-Hromadová i sur. (2011) korištenjem genetičkih markera na mitohondrijskom genomu. Utvrđeno je kako metilji iz Italije dijele mitohondrijske haplotipove

s metiljima sa zapada Sjeverne Amerike, dok su metilji iz Češke, Austrije, Slovačke i Hrvatske genetički povezani i dijele haplotipove s metiljima s jugoistoka Sjeverne Amerike. Novija istraživanja pokazuju nalaz više haplotipova i manju ograničenost pojedinih dijelova SAD-a kao izvorišta za ove metilje u Europi (Sindičić i sur. 2023). Genetičkim istraživanjima (Čisovská Bazsalovicsová i sur. 2015; Husch i sur. 2017) također je utvrđeno da genetički status metilja ne ovisi o vrsti i tipu konačnog nositelja, odnosno da različiti nositelji imaju iste mitochondrijske haplotipove velikog američkog metilja (Sindičić i sur. 2022)



Slika 15. Područja stalnog žarišta velikog američkog metilja u Europi: Italija, jugozapadna (JZ) Poljska i šume doline Dunava (preuzeto iz Králová Hromadová i sur. 2016)

Prvi dokumentirani slučaj facioloidoze u Hrvatskoj datira iz 2000. godine (Marinculić i sur. 2002) kad su u jetri običnog jelena iz istočne Baranje pronađena 22 metilja i zrela jajašca. Otada se veliki američki metilj proširio i na druge dijelove kontinentalne Hrvatske te enzootska područja trenutno obuhvaćaju prostor od Baranje do dijelova Zagrebačke županije.

Pretpostavlja se da je metilj u Hrvatsku stigao širenjem invadiranih puževa dolinom Dunava (Slavica i sur. 2006) i putem prirodne migracije jelena iz Mađarske (Marinculić i sur. 2002). Molekularna istraživanja na markerima mitohondrijske DNA potvrdila su da hrvatska populacija metilja potječe iz dunavskog žarišta (Králová-Hromadová i sur. 2011; Sindičić i sur. 2022).

Zbog velike materijalne i ekološke štete koju predstavlja širenje inavazije velikog američkog metilja, u Hrvatskoj su, kao i u susjednim zemljama pokrenuti programi kontrole i liječenja fascioloidoze, najčešće triklabendazolom i ponekad albendazolom. Kao nosač lijeka najčešće se koristi kukuruz, ali moguće je koristiti i druge nosače kao što je primjerice sol ili posebno pripravljeni mamci (Janicki i sur. 2012).

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Prikupljanje uzoraka obične srne

Uzorci jetara 138 jedinki obične srne prikupljeni su u sklopu projekta Hrvatske zaklade za znanost HRZZ-IP-2018-01-8963 “Interakcija nositelj-parazit: odnos tri različita tipa nositelja prema invaziji metiljem *Fascioloides magna* (MAGNA)”. Suglasnost o etičkoj prihvatljivosti istraživanja dobiveno je od Fakultetskog vijeća Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu na prijedlog Povjerenstva za etiku u veterinarstvu (klasa: 640-01118-17/60; ur. br.: 251-61-44-18-02).

Uzorci su prikupljeni u okviru redovitog odstrela prema lovno-gospodarskim osnovama u lovnim sezonama 2015./2016. – 2021./2022. u lovištima na području Bjelovarsko-bilogorske, Ličko-senjske, Međimurske, Primorsko-goranske i Zagrebačke županije (tablica 3, slika 16). Svaka jetra pregledana je parazitološkom pretragom nakon čega je mali komadić jetre izrezan i spremljen u 96%-tni etanol na -20 °C do daljnjih analiza. Uzorci su podijeljeni na pozitivnu skupinu („slučaj“) u kojoj su uzorci s područja Bjelovarsko-Bilogorske županije, gdje je ranije potvrđeno prisustvo velikog američkog metilja, i negativnu skupinu („kontrola“) u kojoj su uzorci s područja na kojem do trenutka uzorkovanja nije potvrđena njegova prisutnost. Za potrebe genetičkih analiza, ove skupine se u daljnjem tekstu nazivaju isključivo pozitivna i negativna skupina.



Tablica 3. Porijeklo 138 uzoraka obične srne analiziranih u ovom istraživanju i prisutnost velikog američkog metilja (usmeno priopćenje Dean Konjević i Miljenko Bujanić)

Županija	Prisutnost metilja	Godina uzorkovanja	Broj uzoraka
Bjelovarsko-bilogorska	Da	2016-2022	54
Ličko-senjska	Ne	2016-2017	20
Međimurska	Ne	2016-2017	5
Primorsko-goranska	Ne	2016-2017	20
Zagrebačka*	Ne	2016-2017	39
<b>Ukupno</b>			<b>138</b>

\* uzorci su skupljeni na dijelovima Zagrebačke županije gdje do tada nije utvrđen veliki američki metilj



Slika 16. Županije iz kojih potječu uzorci obične srne iz ovog istraživanja, sivom bojom označena su područja u kojima metilj nije prisutan ili nije prisutan u lovištima u kojima su prikupljeni uzorci, a crnom bojom je označeno područje prisutnosti metilja.

### 3.2. Makroskopski pregled jetre obične srne

Parazitološka pretraga jetre provedena je kako bi se potvrdila prisutnost odnosno odsutnost velikog američkog metilja pojedine jedinice i na taj način neizravno i na području uzorkovane županije. Pretraga jetre uključivala je makroskopski pregled znakova invazije metiljem tijekom kojeg je analiziran vanjski izgled i veličina jetre, kao i znaci upalnih promjena, nalaz tamnog pigmenta željezo porfirina, fibrinskih priraslica, nepravilnosti površine jetre i zamućenja Glissonove kapsule (slika 17). Potom je tkivo jetre poprečno rezano na slojeve debljine oko 2 cm i svaki isječak je obostrano detaljno pregledan. Na presjeku jetre zabilježena je pojava migratornih puteva metilja, pseudocista, spolno nezrelih i spolno zrelih metilja, kao i promjena u propadanju. Nalaz vanjskih promjena na jetri, prisutnost željezo-porfirina ili pronalazak bilo kojeg razvojnog stadija metilja ili pseudocista zabilježen je kao pozitivan nalaz na velikog američkog metilja.



Slika 17. Jetra obične srne invadirana velikim američkim metiljem

### 3.3. Izolacija DNA

Izolacija DNA iz komadića jetre provedena je korištenjem komercijalnog kompleta Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, SAD) prema uputama proizvođača uz manje prilagodbe. Skalpelom usitnjeni komadići jetre stavljeni su u Eppendorf tubice u koje je prethodno dodano 300 µL otopine za lizu stanica (Nuclei Lysis Solution). Tubice su potom kratko promiješane i centrifugirane dvije minute na 14 000 rpm. Nakon toga u tubicu je dodano 1,5 µL proteinaze K (20 mg/mL) i smjesa je stavljena na inkubaciju preko noći na temperaturu od 55°C uz neprestano miješanje. Idući dan inkubacija je prekinuta, a tubice su nakon hlađenja na sobnoj temperaturi kratko centrifugirane. Potom je u njih dodano 100 µL otopine za taloženje proteina (Protein Precipitation Solution) i sve zajedno je promiješano i stavljeno na led. Nakon 5 minuta na ledu, tubice su centrifugirane tri minute na 14 000 rpm i supernatant je prebačen u nove Eppendorf tubice u koje je dodano 300 µL 100%-tnog etanola. Sadržaj tubice je promiješan okretanjem, potom je sve centrifugirano jednu min na 14 000 rpm te je supernatant odbačen. Na talog je odpipetirano 300 µL 70% -tnog etanola, tubica je nekoliko puta okrenuta i ponovno centrifugirana jednu minutu. Nakon toga supernatant je odbačen, a talog je osušen i na njega je dodano 100 µL DNA otopine za rehidraciju (DNA Rehydration Solution). Izolirana DNA pohranjena je na -20°C.

### 3.4. Lančana reakcija polimerazom

Odsječak eksona 2 lokusa DRB dug 249 pb umnožen je pomoću reakcije PCR, korištenjem kompleta GoTaq Master Mix (Promega, Madison, SAD), a ukupni volumen reakcijske smjese iznosio je 25 µL (tablica 4) Za umnažanje su upotrijebljene početnice:

LA31 (5'-GATGGATCCTCTCTCTGCAGCACATITCCT)

LA32 (5'-CTTGAATTCGCGCTCACCTCGCCGCT)

koje su razvijene za goveda (Sigurdardóttir i sur. 1991). Temperaturni program reakcije PCR započeo je aktivacijom „Hot start” polimeraze na 95°C tijekom 2 minute. Nakon aktivacije polimeraze, odsječak je umnožen u 34 ciklusa koja su se sastojala od tri ponavljajuća koraka: denaturacija DNA 30 sekundi na 94°C, vezivanje početnica 30 sekundi na 55°C i produljenje lanaca 1 minuta na 72°C. Zatim je uslijedilo završno produljenje u trajanju od 10 minuta na 72°C. Uspješnost reakcija PCR provjerena je elektroforezom na 1%-tnom agaroznom gelu, na koji je uz produkte PCR dodana i negativna kontrola i marker veličine DNA. Svi uzorci koji su se pokazali kao uspješno umnoženi poslani su na Sangerovo sekvenciranje u komercijalni servis

Macrogen (Amsterdam, Nizozemska) gdje su za sekvenciranje korištene iste oligonukleotidne početnice kao i za reakcije PCR.

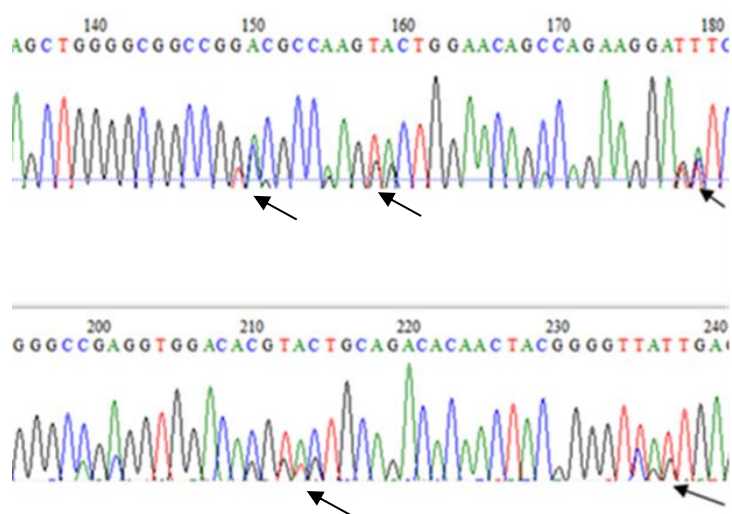
Tablica 4. Komponente reakcije PCR i pripadajući volumeni

<b>Reagens (koncentracija)</b>	<b>Volumen (<math>\mu\text{L}</math>)</b>
GoTaq Master Mix	12,5
Otopina uzvodne početnice (2 $\mu\text{M}$ )	2,5
Otopina nizvodne početnice (2 $\mu\text{M}$ )	2,5
Destilirana voda	5
DNA kalup	2,5
Ukupno	25

Rezultati Sangerovog sekvenciranja dobiveni su u standardnom „.ab1“ formatu te su učitani u program BioEdit (Hall 1999) radi provjere uspješnosti sekvenciranja. Svi rezultati koji su uspješno sekvencirani učitani su u program SeqScape (Applied Biosystems) s ciljem određivanja pojedinačnih alela. Ovaj program uspoređuje alele prisutne u jedinki s referentnom knjižnicom te ih na taj način identificira. Program SeqScape može razdvojiti alele u heterozigotnoj jedinki (gametne faze) ukoliko nije prisutna duplikacija lokusa, pomak okvira čitanja ili insercija/delecija. Tokom pregleda sekvenci utvrđena je otprije poznata delecija kodona 57 koji odgovara ljudskom kodonu 65 (Mikko i sur. 1999; Quéméré i sur. 2015; Bužan i sur. 2022) zbog čega kod heterozigotnih jedinki koje su posjedovale alele različite duljine, program nije bio u mogućnosti razdvojiti gametne faze i identificirati alele i njihove nukleotidne slijedove.

### 3.5. Usporedba metoda genotipizacije

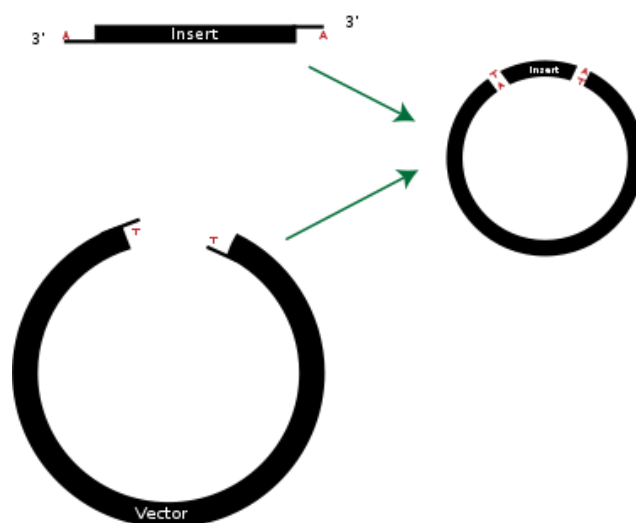
S obzirom na to da je utvrđeno kako nije moguće genotipizirati sve jedinice isključivo Sangerovim sekvenciranjem (slika 18), bilo je potrebno naći odgovarajuću metodu genotipizacije kojom bi se gametne faze mogle razdvojiti. Na malom uzorku od 14 nasumično odabranih heterozigotnih jedinki stoga su testirane tri metode genotipizacije: molekularno kloniranje i dvije platforme za sekvenciranje NGS – platforma Ion Torrent i platforma Illumina.



Slika 18. Elektroferogram heterozigotne jedinice obične srne dobiven nakon Sangerovog sekvenciranja. Strelicama su označeni primjeri nerazriješenih nukleotidnih pozicija

#### 3.5.1. Molekularno kloniranje

Molekularno kloniranje temelji se na ugradnji odsječka od interesa, u ovom slučaju eksona 2 lokusa DRB, u vektor (plazmid) koji se potom unosi u bakterijsku stanicu te umnaža putem klonalnog razmnožavanja bakterija. Zbog toga što u svaki plazmid može biti ugrađen samo jedan alel, na taj način dolazi do razdvajanja gametnih faza u pojedinom uzorku. U ovom istraživanju upotrijebljen je komercijalni paket pGEM-T Easy Vector System (Promega, Madison, SAD) koji koristi princip kloniranja TA. Takav tip kloniranja ne koristi restriksijske enzime, već sposobnost komplementarnih baza timina i adenina da se spajaju uz prisutnost ligaze. Većina komercijalno dostupnih DNA polimeraza na krajeve produkata PCR dodaje adeninske krajeve, a plazmidi za kloniranje na svojim krajevima imaju slobodne timinske krajeve koji se međusobno spajaju u reakciji ligacije (slika 19). Nakon ligacije slijedi unos plazmida u bakterijsku stanicu putem transformacije inducirane toplinom.



Slika 19. Shematski prikaz kloniranja TA.

Za provjeru uspješnosti transformacije koristi se plavo-bijela selekcija koja se oslanja na djelovanje  $\beta$ -galaktozidaze, enzima koji razgrađuje laktozu na glukozu i galaktozu. Enzim  $\beta$ -galaktozidaza prirodno se nalazi u stanicama bakterije *Escherichia coli*, a gen *lacZ* kodira za prvih 146 aminokiselina tog enzima i nalazi se na većini plazmidnih vektora. Vektori korišteni u kloniranju sadržavaju višestruko mjesto za kloniranje (engl. *Multiple cloning site*, MCS) unutar gena *lacZ*. Ukoliko dođe do ciljane ugradnje odsječka u MCS, gen *lacZ* neće biti funkcionalan pa stoga neće doći do stvaranja  $\beta$ -galaktozidaze i razgradnja laktoze će posljedično biti onemogućena. Nasuprot tomu, ukoliko plazmid bez umetnutog odsječka uđe u bakterijsku stanicu, gen *lacZ* će i dalje biti funkcionalan i  $\beta$ -galaktozidaza će razgraditi laktozu. Za odvajanje bakterijskih kolonija koje su usvojile plazmid s ugrađenim odsječkom koristi se X-gal, kromogeni analog laktoze, koji služi kao supstrat  $\beta$ -galaktozidaze. Prilikom razgradnje X-gal stvara se netopivi plavi pigment 5,5'-dibromo-4,4'-dikloro-indigo pa su bakterijske kolonije bez ugrađenog odsječka plave boje, a kolonije koji imaju ugrađen odsječak su bijele boje i one se skupljaju za daljnje postupke. Postupak molekularnog kloniranja deset nasumičnih heterozigotnih jedinki srne započet je reakcijom PCR umnažanja lokusa DRB jer je u ligacijskoj reakciji potrebno koristiti "svježi" produkt PCR. Potom je uslijedila provjera uspješnosti reakcije na agaroznom gelu i pročišćavanje dobivenih produkata PCR pomoću kompleta Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, SAD) prema uputama proizvođača.

Zatim su pripremljene ulazne komponentne ligacijske reakcije: plazmid, enzim ligaza, ligacijski pufer i produkt PCR u količini koji preporučuje proizvođač (tablica 5). Uz osnovne reakcije postavljene su i pozitivna i negativna kontrolna reakcija. Pozitivna kontrola služi za ispitivanje uspješnosti ligacijske reakcije, a umjesto produkta PCR sadržava kontrolni insert. Negativna kontrola provjerava prisutnost kontaminacije pa umjesto produkta PCR sadržava vodu. Sve komponente pomiješane su i stavljene na inkubaciju preko noći na 4°C.

Idući dan provedena je transformacija, odnosno unos plazmidnog vektora u bakterijske stanice. Tubice s ligacijskom reakcijom su centrifugirane te je iz njih prebačeno 2 µL ligacijske smjese u čiste tubice i stavljeno na led. Visoko kompetentni soj stanica *E. coli* JM109 odmrznut je u ledenoj kupelji i po 50 µL je dodano u svaku tubicu s reakcijom smjesom, uključujući pozitivnu i negativnu kontrolu. Nakon 20 minuta na ledu, tubice su izložene toplinskom šoku na 42°C 45-50 sekundi u vodenoj kupelji i vraćene na led. Potom je u reakcijske smjese dodano 950 µL tekućeg medija (engl. lysogeny broth, LB) i sve skupa je stavljeno na inkubaciju na 37°C uz neprestano miješanje. Nakon 90 minuta, 100 µL smjese nanoseno je na kruti medij LB koji je sadržavao ampicilin i prethodno je premazan smjesom X-gal i izopropil β-D-1-tiogalaktopiranozid (IPTG). Dodavanje antibiotika ampicilina omogućava da na hranjivim podlogama izrastu samo bakterije s plazmidom, jer plazmid nosi otpornost na ampicilin, dok IPTG služi kao induktor reakcije razgradnje X-gal. Ploče s hranjivom podlogom i bakterijama inkubirane su preko noći na 37°C. Treći dan provedena je selekcija bijelih kolonija koje su usvojile plazmid s ugrađenim odsječkom. Sakupljeno je po 15 kolonija po uzorku i svaka od njih je pojedinačno prebačena u epruvetu s tekućim LB medijem. Epruvete su stavljene na inkubaciju preko noći na 37°C kako bi se kolonije razmnožile.

Četvrti dan je provedena završna faza molekularnog kloniranja - pročišćavanje plazmida iz bakterijskih stanica korištenjem kompleta Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega, Madison, SAD) pridržavajući se uputa proizvođača. Nakon pročišćavanja, plazmidi otopljeni u vodi bez nukleaza poslani su na sekvenciranje u servis MacroGen. Dobiveni rezultati ponovno su pregledani u programima BioEdit i SeqScape te su utvrđeni prisutni aleli.

Tablica 5. Prikaz komponenti ligacijske reakcije

Reagens	Volumen komponenti ( $\mu\text{L}$ )		
	Uzorak	Pozitivna kontrola	Negativna kontrola
pufer	5	5	5
T4 plazmid (vektor)	1	1	1
kontrolni insert	-	2	-
produkt PCR	1	-	-
T4 DNA ligaza	1	1	1
voda	2	1	3

### 3.5.2. Platforma Ion Torrent

U prvom koraku pripreme knjižnice provedena je reakcija PCR u triplikatima korištenjem početnica LA31 i LA32 na koje su prethodno vezani adapteri i barkodovi iz kompleta Ion Xpress™ BarcodeAdapters (ThermoFisher Scientific, Waltham, SAD). Adapteri služe da vezivanje fragmenta na čip za sekvenciranje dok barkodovi omogućavaju naknadnu identifikaciju pojedinog uzorka. Na početnicu LA31 na kraju 5' vezan je adapter A, barkod i vezni odsječak, a na reverznu početnicu LA32 na kraju 5' vezan je adapter P1 koji služi za povezivanje fragmenta sa sfernim česticama tijekom emulzijskog PCR-a. Nakon reakcije PCR i provjere uspješnosti elektroforezom na agaroznom gelu, triplikati pojedinog uzorka spojeni su u jednu tubicu i pročišćeni pomoću magnetnih kuglica Agencourt AMPure XP (Agencourt Bioscience Corporation, Beverly, SAD). Magnetne kuglice dodane su u produkte PCR pa je smjesa kratko promiješana, centrifugirana te inkubirana 5 minuta na sobnoj temperaturi. Potom su tubice sa smjesom produkta PCR i kuglica stavljene na stalak s magnetom na 3 minute kako bi se kuglice odvojile od ostatka otopine. Ostatak tekućine je odpipetiran, a kuglice su isprane s 500  $\mu\text{L}$  70% etanola. Etanol je nakon 30 sekundi odpipetiran, a kuglice su ostavljene da se suše 5 minuta. Potom je na suhe kuglice dodano 30  $\mu\text{L}$  vode bez nukleaza, i sve skupa je kratko promiješano. Tubice su nakon toga ponovno stavljene na magnetni stalak kako bi se kuglice



odvojile, a voda s otopljenim odsječcima DNA prebačena je u nove tubice. Po završetku pročišćavanja svim uzorcima određena je koncentracija pomoću uređaja Qubit 3.0, uzorci su spojeni u jednu tubicu prema odgovarajućim koncentracijama i postupak pročišćavanja magnetnim kuglicama je ponovljen. Uređaj 2100 Bioanalyzer Instrument (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD) upotrijebljen je za provjeru kvalitete i veličine odsječaka pripremljene knjižnice uz pomoć seta Agilent high-sensitivity DNA (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD). Knjižnica je nakon toga razrijeđena do koncentracije od 100 pM. U sljedećem koraku odsječci su vezani na sferne čestice i umnoženi u emulzijskom PCR-u, nakon čega su sferne čestice obogaćene (engl. *enriched*), odnosno selektivno su umnožene one čestice koje su vezane za odsječke DNA, nanosene na čip i sekvencirane na uređaju Ion S5 (Thermo Fisher, Waltham, SAD).

### 3.5.3. Platforma Illumina

Uzorci su obrađeni i sekvencirani u servisu Novogene (Cambridge, UK) na sljedeći način: izmjerena je koncentracija i čistoća izolirane DNA, te je pripremljena knjižnica dijelova DNA za sekvenciranje tako da je provedena reakcija PCR korištenjem početnica LA31 i LA32 uz dodatak odgovarajućih barkodova. Uspješnost reakcije PCR provjerena je elektroforezom na agaroznom gelu. Nakon toga uslijedio je proces popravka krajeva fragmenata (engl. *end-repairing*) u kojem su formirani ujednačeni tupi krajevi te fosforilirani krajevi 5'. Na takve fragmente dodani su repovi adenina na krajeve 3' i oni su spojeni sa specifičnim Illumina adapterima P5 i P7 koji omogućavaju vezanje za protočnu komoricu. Knjižnica NGS je potom pročišćena korištenjem magnetnih kuglica, kvantificirana i sekvencirana s PE250 načinom sekvenciranja na uređaju MiSeq (Illumina, San Diego, SAD).

### 3.5.4. Analiza sirovih podataka NGS

Rezultati sekvenciranja na Illumina i Ion Torrent platformi dobiveni su u formatu FASTQ koji je karakterističan za podatke dobivene sekvenciranjem NGS. Format FASTQ je tekstualni tip podataka za pohranu sekvenci i sastoji se od četiri retka: (1) identifikator sekvence s dodatnim informacijama (2) sekvenca s nukleotidnim bazama A, C, T, G i N (3) separator, obično znak + (4) ocjena kvalitete pojedine baze (engl. *base quality score*). Ocjene kvalitete nazivaju se Phred te su kodirane pomoću znakova ASCII koji predstavljaju pojedine numeričke bodove, odnosno ocjene. Kod paired-end sekvenciranja Illumina za svaki uzorak dobivene su

dvije datoteke FASTQ – datoteka R1 FASTQ u kojem se nalaze sekvence uzvodnog smjera i datoteka R2 s pripadajućim sekvencama koje su sekvencirane iz nizvodnog smjera. Analiza sirovih podataka FASTQ napravljena je u setu web programskih alata Amplicon Sequencing Analysis Tools (AmpliSAT) (Sebastian i sur. 2016) (dostupno na: <http://evobiolab.biol.amu.edu.pl/amplisat>), posebno razvijenih za obradu NGS amplicon eksperimenata kao što su genotipizacija MHC i receptora TLR ili metabarkodiranje. AmpliSAT se sastoji od više programskih modula, od kojih sam koristila sljedeće:

- AmpliMERGE – spaja očitavanja R1 i R2 nastala obostranim sekvenciranjem korištenjem platforme Illumina. Proces spajanja nadoknađuje sekvencirana područja niže kvalitete i omogućuje produljenje očitavanja npr. Illumina PE250: spajanje obostranih očitavanja od 250 pb u jedinstvenu sekvencu omogućuje ukupnu duljinu sekvence od 500 pb. Ovaj modul koristi algoritam FLASH (Magoč i Salzberg 2011) s optimalnim parametrima preklapanja.
- AmpliCLEAN – odbacuje očitavanja niske kvalitete i abnormalne duljine. Također, podaci često sadržavaju rezultate sekvenciranja drugih eksperimenata koji su zajedno sekvencirani, a modul AmpliCLEAN međusobno ih odvaja na temelju jedinstvenog nukleotidnog barkoda svakog uzorka.
- AmpliCHECK – služi preliminarnoj analizi, odnosno inicijalnoj provjeri rezultata sekvenciranja. Daje podatke o prosječnoj duljini, pokrivenosti (engl. coverage), učestalosti najčešćih sekvenci i artefaktima (sekvencama koje nastaju kao greške tijekom sekvenciranja). Na taj način modul AmpliCHECK omogućuje postavljanje optimalnih parametara kod idućeg koraka analize.
- AmpliSAS – najvažniji modul, koristi se za finalnu genotipizaciju podataka. Analiza AmpliSAS podijeljena je u tri koraka: (1) demultipleksiranje očitavanja u amplicone i jedinstvene sekvence prema zadanim početnicama i barkodovima (2) klasteriranje, odnosno grupiranje sekvenci potencijalnih alela i artefakata prema korisnički zadanim parametrima (3) filtriranje sekvenci prema parametrima kao što su: učestalost, pokrivenost, duljina postojanje kimernih sekvenci, pomaka u okviru čitanja i drugog. Verzija AmpliSAS modula dostupna na internetu koristi samo prvih 5000 očitavanja svakog amplicona kako bi se smanjilo opterećenje servera i ubrzala analiza. Potencijalno se skripta programa AmpliSAS može pokrenuti lokalno na računalu i tada se mogu analizirati sva prisutna očitavanja.

Sirovi podaci sekvenciranja Illumina prvotno su učitani u modul AmpliMERGE s ciljem spajanja očitavanja iz smjera R1 i R2. Kod podataka s platforme Ion Torrent taj je korak preskočen jer su očitavanja dobivena samo iz jednog smjera. Potom su spojene datoteke učitane u modul AmpliCLEAN. U podatke o ampliconu (engl. amplicon data) navedeno je ime markera, sekvence početnica, ime gena, vrste te svih uzoraka u setu podataka. Parametar minimalne kvalitete očitavanja prema Phred vrijednosti namješten je na 30 čime su odstranjene sve sekvence čija je točnost očitavanja manja od 99%. Također su odstranjene i sve sekvence kraće od 307 pb i dulje od 317 pb. Datoteka s rezultatima filtracije AmpliCLEAN potom je učitana u modul AmpliCHECK gdje je provedena preliminarna provjera podataka. Pri tome su korišteni zadani parametri za platformu Illumina (supstitucijske pogreške 1%, indeli 0,001%), odnosno platformu Ion Torent (supstitucijske pogreške 0,5%, 1% indeli), minimalna učestalost dominantne sekvence u klasteru (engl. minimum dominant frequency) ostavljena je na 25%, a minimalna učestalost amplicona postavljena je na 1%. U program je učitana i knjižnica svih poznatih alela obične srne koje je preuzeta iz baze podataka GenBank (dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Prema rezultatima analize AmpliCHECK namješteni su parametri u modulu AmpliSAS. I ovdje su korišteni zadani parametri za platformu Illumina, odnosno platformu Ion Torrent, minimalna učestalost dominantne sekvence od 25%, minimalna učestalost amplicona od 1% te su kod klasteriranja (grupiranja) dominantne sekvence ispravljene prema knjižnici dosad poznatih alela srna koja je učitana u formatu FASTA. Uspoređeni su rezultati kloniranja te sekvenciranja na platformi Illumina i Ion Torrent. S obzirom da su sva tri metodološka pristupa dala iste genotipove za testirane uzorke (detalji su prikazani u poglavlju Rezultati), analiza na preostalim uzorcima nastavljena je na platformi Illumina s obzirom na najbolji omjer cijene i utrošenog vremena. Stoga je preostalih 128 uzoraka poslano je na sekvenciranje u servis Novogene na uređaju Illumina MiSeq. Kvaliteta dobivenih podataka provjerena je u programu FASTQC, a sirovi podaci spojeni su u modulu AmpliMERGE. Nakon toga, postupak filtriranja u modulu AmpliCHECK i genotipizacije u AmpliSAS-u ponovljen je kao što je već ranije opisano. Dobiveni aleli izdvojeni su i pripremljeni za daljnje analize u programu BioEdit.

### **3.6. Procjena genetičke raznolikosti**

Određivanje jedinstvenih alela, broj segregirajućih (varijabilnih) pozicija, nukleotidni diverzitet  $\pi$  i prosječan broj nukleotidnih razlika određeni su pomoću programa DNA Sequence Polymorphism (DNASp) (Librado i Rozas 2009). U programu MEGA X (Kumar i sur. 2018)

određene su vrijednosti nukleotidne i aminokiselinske evolucijske udaljenosti između pronađenih alela prema najpogodnijem supstitucijskom modelu primjenom opcije ML “Model selection”, kao i srednje vrijednosti tih evolucijskih udaljenosti. Najpogodnijim modelom smatra se onaj s najmanjim iznosom Bayesovog informacijskog kriterija (Bayesian Information Criterion), što je u slučaju nukleotidnih supstitucija bio Tamura 3- parametar model (T92) uz gama distribuciju za negativnu skupinu i Jukes Cantor (JC) model za pozitivnu skupinu, dok za aminokiselinske supstitucije najpogodniji model bio Jones-Taylor-Thornton (JTT) + G.

Alelna bogatstvo (engl. allelic richness), mjera kojom se uspoređuje broj alela između populacija neovisno o broju uzoraka, izračunato je pomoću programskog paketa FSTAT (Goudet 2001). Alelna bogatstvo određuje se primjenom metode razrjeđivanja (engl. *rarefaction method*), kojom se svaki set podataka svede na veličinu najmanjeg seta podataka, u ovom slučaju broj uzoraka s područja pozitivnog na metilja (25).

Program Arlequin (Excoffier i sur. 2005) korišten je za određivanje učestalosti pojedinog alela te za računanje odstupanja od Hardy-Weinberg ravnoteže. Za procjenu odstupanja od Hardy-Weinberg ravnoteže korišteno je 100 000 koraka Markovljevih lanaca uz 10 000 dememorizacijskih koraka. U programu Arlequin provedena je i analiza molekularne varijance (engl. Analysis of Molecular Variance, AMOVA) (Excoffier i sur. 1992) korištenjem matrice euklidskih udaljenosti između različitih alela. Test AMOVA je prilagođena verzija analize varijance (ANOVA) koja se temelji na zakonu ukupne varijance, gdje se ukupna varijanca određene varijable raščlanjuje na komponente koje se pripisuju različitim izvorima varijabilnosti. Prilikom testa AMOVA provode se usporedbe između različitih skupina uzoraka procjenom  $F_{ST}$  indeksa fiksacije uz 1000 permutacija.

### **3.7. Testovi selekcije i rekombinacije**

Za ispitivanje prisutnosti selekcije u novije evolucijsko doba (otprije desetak generacija do nekoliko tisuća generacija) upotrijebljen je Ewens-Watterson test homozigotnosti i Slatkinov egzaktni test, modifikacija testa homozigotnosti, oba implementirana u program Arlequin. Ewens-Watterson test uspoređuje uočene razine homozigotnosti ( $F$ ) s onima koji se očekuju pod ravnotežom migracije i genetičkog drifta (Ewens 1972; Watterson 1978; Slatkin 1996). Vrijednosti  $F$  nalaze se u rasponu od 0 do 1, gdje vrijednosti blizu 0 ukazuju na ravnotežnu selekciju, vrijednosti oko 0,5 na neutralnost, a vrijednosti blizu 1 ukazuju na usmjerenu selekciju (Miller i sur. 2001).

Za procjenu djelovanja dugoročne (povijesne) pozitivne selekcije korištene su metode Tajima's D i dN/dS test. Tajima's D test također je implementiran u Arlequin, a temelji se na usporedbi broja segregirajućih mjesta u sekvencama s prosječnim brojem uparenih razlika između nukleotida. Očekivani iznos Tajima's D indeksa je negativan u slučaju purificirajuće (negativne selekcije), pozitivan u slučaju ravnotežne selekcije, a jednak nuli u slučaju neutralnosti (Tajima 1989). Omjer nesinonimnih i sinonimnih mutacija koristi se za dN/dS test kojim se procjenjuje dugotrajni učinak selekcije kroz evolucijsku povijest. Ukoliko prevladavaju sinonimne mutacije, omjer dN/dS bit će  $<1$  što ukazuje na purificirajuću (negativnu) selekciju, dok omjer  $>1$  ukazuje na djelovanje pozitivne selekcije u evolucijskoj povijesti. Neutralnost će biti izražena kroz jednaki broj sinonimnih i nesinonimnih mutacija, odnosno ako je njihov omjer  $=1$ . U programu MEGA X provedeno je i testiranje pozitivne selekcije korištenjem Z-testa (engl. Codon-based Z-test of selection) na čitavoj sekvenci, koji odbacuje nultu hipotezu ( $H_0$ )  $dN=dS$  u korist alternativne ( $H_A$ )  $dN>dS$  ukoliko je omjer dN/dS statistički značajno veći od 1. Broj sinonimnih i nesinonimnih supstitucija utvrđen je modificiranom Nei-Gojobori metodom (Nei i Gojobori 1986) uz Jukes-Cantor korekciju za višestruke supstitucije (Jukes i Cantor 1969), dok je varijanca izračunata korištenjem 1000 bootstrap ponavljanja.

S obzirom na to da program MEGA procjenjuje prisutnost pozitivne selekcije na čitavoj sekvenci, a poznato je da selekcija djeluje na pojedinačne kodone, posebice one povezane s PBD regijama, napravljeni su i testovi prisutnosti prirodne selekcije na pojedinačnim kodonima. Prvo, program EasyCodeML (Gao i sur. 2019) korišten je za identifikaciju kodona na koje djeluje pozitivna selekcija putem metode maksimalne vjerodostojnosti (engl. Maximum likelihood, ML). Program procjenjuje omjer dN/dS ( $\omega$ ) između kodonskih pozicija primjenjujući različite modele evolucije. Nukleotidno poravnanje 10 alela pronađenih u ovom istraživanju učitano je u program u PAML formatu uz jednostavno filogenetsko stablo u Newick formatu. Korišten je predefinirani *Nested* modul pokretanja, uz primjenu evolucijskih modela M7 i M8, gdje M7 predstavlja nulti model koji pretpostavlja neutralnu evoluciju, dok M8 predstavlja alternativni model koji obuhvaća pozitivnu selekciju. Oba evolucijska modela pretpostavljaju beta distribuciju  $\omega$ .

Nadalje, selekcija na pojedinačnim kodonima ispitana je pomoću nekoliko metoda implementiranih u HyPhy programski paket koji je dostupan na Datamonkey web serveru (Martin i sur. 2010). Metoda FEL (Fixed Effects Likelihood) (Kosakovsky Pond i Frost 2005) koristi ML pristup za procjenu stopa sinonimnih i nesinonimnih supstitucija na kodirajućem nukleotidnom poravnanju i pripadajućem filogenetskom stablu. Ova metoda pretpostavlja da je selekcijski pritisak za svaku poziciju konstantan na svim sljedovima. Metoda FUBAR (Fast,

Unconstrained Bayesian AppRoximation) (Murrell i sur. 2013) koristi Bayesov pristup, te kao i metoda FEL pretpostavlja da je selekcijski pritisak konstantan. Ipak, za razliku od metode FEL koja koristi p-vrijednosti za računanje statističke podržanosti testa, u metodi FUBAR dokaze za selekciju pružaju posteriorne vjerojatnosti u rasponu od 0 do 1. Vrijednosti posteriornih vjerojatnosti  $>0,9$  se smatraju snažnim indikacijama djelovanja pozitivne selekcije. Također, FUBAR je brža metoda s većom statističkom snagom, posebice kod slabog djelovanja pozitivne selekcije gdje su vrijednosti  $\omega > 1$  vrlo male. Metoda MEME (Mixed Effects Model of Evolution) (Murrell i sur. 2012) koristi ML pristup mješovitih učinaka za utvrđivanje sporadičnih djelovanja pozitivne selekcije na određene kodone. Za procjenu  $\omega$ , MEME računa jednu  $\alpha$  (dS) i dvije  $\beta$  (dN) vrijednosti,  $\beta+$  i  $\beta-$  za svaku poziciju kodona. Djelovanje pozitivne selekcije je potvrđeno ako je  $\beta+ > \alpha$  uz statističku značajnost.

Za ispitivanje intralokusnih rekombinantnih događaja također je upotrijebljen HyPhy programski paket, odnosno u njega implementirana metoda GARD (Genetic Algorithm for Recombination Detection) (Kosakovsky Pond i sur. 2020). Metoda GARD testira višestruko sravnate sekvence kako bi se utvrdile točke prekida i alternativni filogenetički scenariji. Program RDP4 (Recombination Detection Program) v 4.82 (Martin i sur. 2010) upotrijebljen je za specifikaciju rekombinantnih događaja jer je u mogućnosti je identificirati rekombinantne sekvence, kao i njihove parentalne sekvence koristeći konsenzus rezultata različitih filogenetičkih i statističkih metoda. Na nukleotidnom sravnanju alela pronađenih u ovom istraživanju korištene su metode RDP (Martin i Rybicki 2000), Geneconv (Padidam i sur. 1999), Chimera (Posada i Crandall 2001), MaxChi (Smith 1992), BootScan (Martin i sur. 2005), SiScan (Gibbs i sur. 2000) i 3Seq (Lam i sur. 2018). Za analizu su korištene zadane postavke, uključujući statističku značajnost na razini 0,05 i Bonferroni korekcije za višestruke usporedbe. Nadalje, za testiranje preliminarnih hipoteza korištene su metode koje su dostupne u programu, kao što su filogenetička stabla, MaxChi grafovi i matrice. U obzir su na kraju uzeti samo rekombinantni događaji koji su potvrđeni s barem dvije metode.

### **3.8. Evolucijski odnosi**

Istraživanja koja se bave intraspecijskom varijacijom u nukleotidnom slijedu obično koriste dva tipa grafičkog prikaza evolucijskih odnosa između podataka – filogenetska stabla i/ili haplotipske mreže. Filogenetsko stablo je zbog svoje strukture isključivo vertikalni prikaz prijenosa DNA između pojedinih genskih varijanti, dok haplotipska mreža omogućava prikaz horizontalnog transfera genetskog materijala putem mehanizama kao što su hibridizacija,

rekombinacija, transformacija, infekcija virusima i slično, odnosno retikularne evolucije (Mardulyn 2012).

Evolucijski odnosi između alela DRB obične srne pronađenih u ovom istraživanju i onih prethodno opisanih, istraženi su pomoću dva filogenetska stabla konstruirana u programu MEGA X (Kumar i sur. 2018). U bazama podataka IPD-MHC i GeneBank pronađeni su već poznati aleli obične srne kao i aleli drugih pripadnika porodice jelena. Za izradu prvog filogenetskog stabla u obzir je uzeto 20 alela od kojih 15 alela pripada srni, a pet alela jelenu s područja Hrvatske (Bujanić i sur. 2020). Nukleotidni supstitucijski model s najmanjim BIC rezultatom bio je T92 + G te je on korišten pri konstruiranju stabla statističkom metodom ML uz 1000 *Bootstrap* ponavljanja. Broj diskretnih gama kategorija namješten je na četiri. Drugo filogenetsko stablo konstruirano je kako bi se prikazali evolucijski odnosi između alela DRB obične srne i drugih pripadnika porodice jelena. Korišteno je po pet nasumično odabranih alela DRB losa (*Alces alces*), običnog jelena (*Cervus elaphus*), sika jelena (*Cervus nippon*), bjelorepog jelena (*Odocoileus virginianus*), pririjskog bjelorepog jelena (*Odocoileus hemionu*), karibua (*Rangifer tarandus*). Najpogodniji nukleotidni supstitucijski model ovdje je bio JC+G, a ovo filogenetsko stablo konstruirano je također upotrebom metode ML uz 1000 *Bootstrap* ponavljanja i četiri diskretne gama kategorije. Za prikaz odnosa isključivo između alela utvrđenih u ovom istraživanju korištena je *Median Joining* (MJ) (Bandelt i sur. 1999) mreža konstruirana u programu Network 10 (dostupno na fluxus-engineering.com). Algoritam MJ stvara mreže koje u jednoj grafičkoj figuri sadržavaju više mogućih stabala i pogodne su za korištenje intraspecijskih podataka s manjim rasponom međusobnih genetičkih razlika (Kong i sur. 2016). Vrijednost epsilon postavljena je na 0 kako bi se prilikom konstrukcije mreže u obzir uzele samo najkraće moguće poveznice.

### **3.9. Povezanost alela Caca-DRB s prisutnošću velikog američkog metilja**

Za utvrđivanje eventualne povezanosti alela lokusa DRB i fascioloidoze, testirane su jednakosti distribucija alela između pozitivne skupine (skupine slučaj) i negativne skupine (skupine kontrola). U pozitivnoj skupini nalaze se sve jedinke s područja na kojem je ustanovljena prisutnost velikog američkog metilja (Bjelovarsko-bilogorska županija), bez obzira na to što nisu sve jedinke s tog područja bile invadirane, s obzirom na to da postoji mogućnost da su roditeljske generacije ovih jedinki bile u kontaktu s metiljem. Pretpostavka je da je čitava populacija na pozitivnom području pod selekcijskim pritiskom metilja. Za testiranje distribucija alela korišteni su statistički testovi jednakosti proporcija. Svi testovi provedeni su

u programskom jeziku R (R x64 3.6.1). Hi-kvadrat ( $\chi^2$ ) testom o homogenosti testirana razdioba alela unutar pozitivne i negativne skupine. Ovaj test primjer je neparametrijskog testa koji se provodi na kategoričkim varijablama iz dvije ili više populacija kako bi se utvrdilo imaju li istu distribuciju. Nulta hipoteza Hi-kvadrat testa homogenosti pretpostavlja da je distribucija kategoričkih varijabli (alela lokusa DRB) homogena između dviju populacije (pozitivne i negativne skupine) te nam daje p-vrijednost za testiranje te hipoteze. Ukoliko je p-vrijednost manja od 0,05, nulta hipoteza se odbacuje u korist alternativne koja pretpostavlja prisutnost heterogenih distribucija kategoričkih varijabli, odnosno statistički značajnu razliku između distribucija alela u pozitivnoj i negativnoj skupini. U ovom istraživanju Hi-kvadrat test proveden je na dva načina. U prvoj varijanti testirana je kombinacija alela unutar jedinki u pozitivnoj, odnosno negativnoj skupini. U ovom testu osim učestalosti alela u svakoj skupini testira se i kombinacija alela u jedinki. Svakoj jedinki pridružen je jedinstveni broj na sljedeći način: za svaku jedinku dobivena je uređena 10-torka, s obzirom da je u čitavom setu podataka pronađeno 10 alela, koja na određenom mjestu 1-10 ima broj 2 ako se alel označen i-tim mjestom pojavljuje dvaput u toj jedinki (homozigot), broj 1 ako se taj alel u jedinki pojavljuje jednom, a broj 0 ako jedinka ne posjeduje taj alel. Nakon što je uređena 10-torka dobivena za svaku jedinku (54 jedinke u pozitivnoj skupini, a 84 u negativnoj skupini), za svaku jedinku dobiven je jedinstven broj

$$\sum_{j=1}^{10} 3^{j-1} a(j),$$

gdje je  $a(j)$  broj 0, 1 ili 2 u 10-znamenkastom broju. Ovaj broj korišten je za provođenje Hi-kvadrat testa.

U drugoj varijanti testa provjerena je razdioba alela ne uzimajući u obzir kombinaciju različitih alela u jedinki već je određeno u koliko se uzoraka alel pojavljuje na bilo kojem od dva moguća mjesta, a u koliko se pojavljuje kao homozigot (dvaput u istoj jedinki). Tako su dobivene razdiobe brojeva 0, 1 i 2 koje su provjerene Hi-kvadrat testom.



## 4. REZULTATI

### 4.1. Potvrda prisutnosti metilja parazitološkom pretragom jetre obične srne

Parazitološkom pretragom jetre utvrđena je prisutnost velikog američkog metilja u 25 jedinki iz Bjelovarsko-bilogorske županije, od ukupno pregledanih 54 jedinke (što čini prevalenciju od 46,3%), te niti u jednoj jedinki iz ostalih područja (od pregledanih 84 jedinke). Time su potvrđena prethodna saznanja o rasprostranjenosti velikog američkog metilja, odnosno da je tijekom razdoblja uzorkovanja metilj bio prisutan samo na području Bjelovarsko-bilogorske županije (2016.-2022. godina), a odsutan na području Ličko-senjske, Međimurske, Primorsko-goranske i Zagrebačke županije (2016.- 2017. godina).

### 4.2. Usporedba metoda genotipizacije lokusa DRB u obične srne

Prvi korak ovog istraživanja bio je usporedba tri različite metode genotipizacije lokusa DRB u obične srne provedeno na 14 uzoraka (Svetličići sur. 2022) (tablica 6, tablica 7):metoda sekvenciranja slijedeće generacije na platformi Illumina MiSeq i Ion Torrent 5S te molekularno kloniranje plazmidnim vektorom uz koje se provodi klasično (Sangerovo) sekvenciranje. . Identični aleli DRB pronađeni su korištenjem sve tri metode (Illumina, IonTorrent i molekularno kloniranje) u svakom od testiranih uzoraka te nisu pronađena više od dva alela po uzorku čime je potvrđeno postojanje samo jednog lokusa DRB u obične srne (tablica 7). Nakon filtriranja prema veličini i kvaliteti korištenjem modula AmpliCLEAN, sekvenciranjem na platformi Illumina dobiveno je ukupno 1 202 786 očitavanja, a sekvenciranjem na platformi Ion Torrent 876 347 očitavanja. Pokazano je da je 5000 očitavanja koje nudi web alat AmpliSAT dovoljno za određivanje alela DRB u vrsta s jednim lokusom bez obzira na izbor platforme NGS. Također, ustanovljeno je i da je 15 rekombinantnih klonova po jedinki dovoljno za utvrđivanje alela u svim jedinkama, što se slaže i s rezultatima prethodnih istraživanja (Swarbrick i sur. 1995, Arbanasić i sur. 2019).

Postotak očitavanja pripisan alelima bio je vrlo sličan između sekvenciranja Illumina i Ion Torrent te je prosječno iznosio 86,1% za Illuminu i 85.8% za Ion Torrent (tablica 6). Pojedinačni broj očitavanja po alelu iznosio je 1 580 do 2 730 za Illuminu i 1 008 do 3 446 za Ion Torrent. Nakon sekvenciranja na platformi Illumina, omjeri učestalosti utvrđenih alela u uzorku bili su približno u omjeru 1:1 s najvećim odstupanjem u uzorku L2 gdje su učestalosti alela bile 54,1 % : 43.1%. Omjeri učestalosti utvrđenih alela nakon sekvenciranja na platformi Ion

Torrent bili su nešto više nejednolični, posebice u uzorku L5 gdje je omjer učestalosti iznosio 20,6% : 64,5% (slika 20). Rezultati molekularnog kloniranja bili su u skladu s rezultatima sekvenciranja NGS pa je u svakom uzorku odgovarajući alel utvrđen barem u jednom rekombinantnom klonu od 15 koliko ih je prikupljeno po svakom uzorku. Najveći prosječni broj očitavanja po utvrđenom alelu nakon sekvenciranja na platformi Illumina imao je alel Caca-DRB\*0402 (1823,0), dok je nakon sekvenciranja na platformi Ion Torrent alel s najvećim prosječnim brojem očitavanja bio Caca-DRB\*0304 (3109,5) (tablica 8).

Tablica 6. Broj očitavanja dobiven sekvenciranjem NGS na platformama Illumina (ILL) i Ion Torrent (IT) lokusa DRB u preliminarnom istraživanju na 14 jedinki obične srne. Srednje vrijednosti su podebljane. Preuzeto i prilagođeno iz Svetličić i sur. 2022.

Uzorci	ILL		IT	
	Ukupni broj očitavanja	Udio očitavanja pripisan alelima (%)	Ukupni broj očitavanja	Udio očitavanja pripisan alelima (%)
1SL	64 741	84,8	46 284	86,6
1SN	67 351	81,8	43 199	83,8
2SL	105 622	80,6	84 030	83,0
3SL	83 552	71,2	59 798	82,7
4SC	59 407	84,2	59 520	85,8
12SC	73 516	91,7	112 812	89,1
13SC	94 244	82,6	63 530	85,7
14SC	109 486	94,3	37 696	86,7
K7	72 908	87,5	115 259	84,1
K10	69 648	84,9	41 700	85,8
L2	112 464	97,1	64 820	89,7
L5	122 904	84,3	58 535	85,2
L19	68 869	81,7	67 586	84,3
L20	98 074	98,0	21 578	88,1
<b><u>AVG</u></b>	<b>85 913</b>	<b>86,1</b>	<b>62 596</b>	<b>85,8</b>

Tablica 7. Broj sekvenci dobiven kloniranjem (Klon) i učestalosti očitavanja (%) alela nakon sekvenciranja lokusa DRB na platformama Illumina (ILL) i Ion Torrent (IT) u 14 jedinki obične srne. Preuzeto i prilagođeno iz Svetličić i sur. 2022.

Uzorci		1SL			1SN			2SL			3SL		
Aleli	Klon	ILL	IT	Klon	ILL	IT	Klon	ILL	IT	Klon	ILL	IT	
Caca-DRB*0102	2	43,44	34,48	2	40,42	41,06	3	38,78	34,38	1	39,62	34,34	
Caca-DRB*0301													
Caca-DRB*0302				1	41,36	42,78							
Caca-DRB*0304													
Caca-DRB*0401													
Caca-DRB*0402							4	41,78	48,62				
Caca-DRB*0403	3	41,32	52,08							4	31,6	48,34	
Caca-DRB*0405													

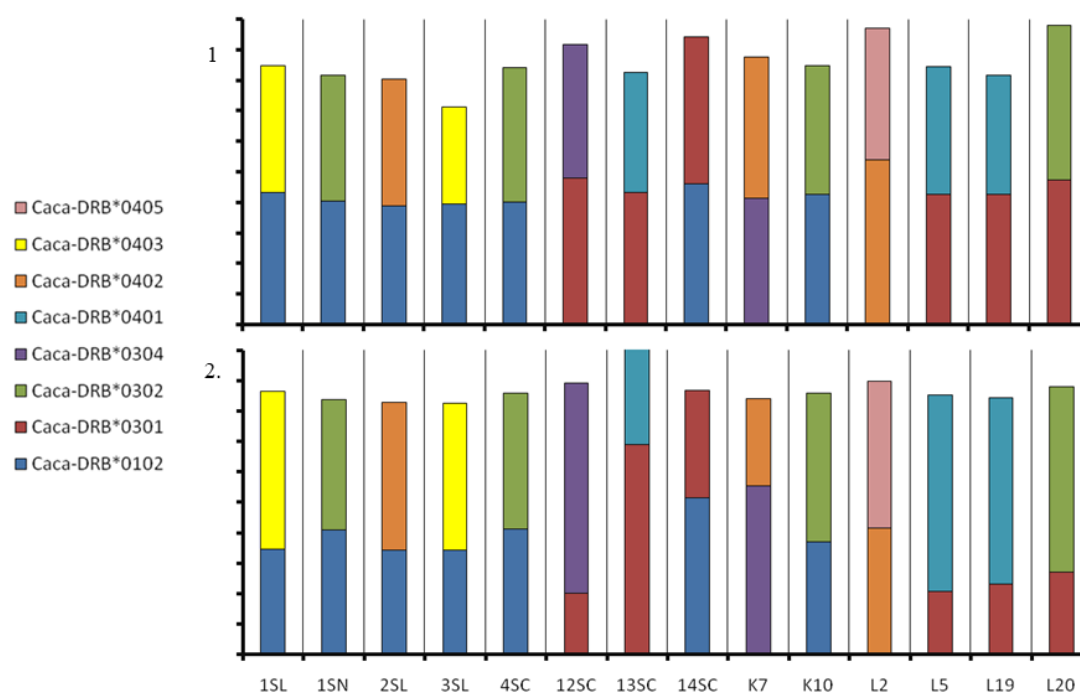
Uzorci		4SC			12SC			13SC			14SC		
Aleli	Klon	ILL	IT	Klon	ILL	IT	Klon	ILL	IT	Klon	ILL	IT	
Caca-DRB*0102	2	40,06	41,34							4	46,02	51,52	
Caca-DRB*0301				4	47,92	20,16	1	43,40	30,14	2	48,26	35,22	
Caca-DRB*0302	2	44,16	44,50										
Caca-DRB*0304				4	43,76	68,92							
Caca-DRB*0401							3	39,24	55,58				
Caca-DRB*0402													
Caca-DRB*0403													
Caca-DRB*0405													

Uzorci		K7			K10			L2			L5		
Aleli	Klon	ILL	IT	Klon	ILL	IT	Klon	ILL	IT	Klon	ILL	IT	
Caca-DRB*0102				1	42,82	37,02							
Caca-DRB*0301										3	42,64	20,62	
Caca-DRB*0302				1	42,08	48,82							
Caca-DRB*0304	5	41,30	55,46										
Caca-DRB*0401										3	41,70	64,54	
Caca-DRB*0402	3	46,24	28,60				2	54,06	41,68				
Caca-DRB*0403													
Caca-DRB*0405							3	43,08	48,04				

Uzorci		L19			L20		
Aleli	Klon	ILL	IT	Klon	ILL	IT	
Caca-DRB*0102							
Caca-DRB*0301	2	42,56	23,04	4	47,32	27,12	
Caca-DRB*0302				3	50,70	60,96	
Caca-DRB*0304							
Caca-DRB*0401	5	39,14	61,26				
Caca-DRB*0402							



Slika 20. Omjer očitavanja alela DRB dobivenih nakon sekvenciranja na platformi 1 – Illumina i 2- Ion Torrent u preliminarnom istraživanju na 14 jedinki obične srne (Preuzeto i prilagođeno iz Svetličić i sur. 2022).

Tablica 8. Prosječni broj očitavanja po alelu MHC-DRB obične srne nakon sekvenciranja na platformama Illumina (ILL) i Ion Torrent (IT) u 14 jedinki obične srne.

Alel	ILL	IT
Caca-DRB*0102	2079,7	1958,1
Caca-DRB*0301	2267,5	1302,5
Caca-DRB*0302	2228,8	2463,3
Caca-DRB*0304	2126,5	3109,5
Caca-DRB*0401	2001,3	3023,0
Caca-DRB*0402	2368,0	1981,7
Caca-DRB*0403	1823,0	2510,5
Caca-DRB*0405	2154,0	2402,0

### **4.3. Aleli i genotipovi lokusa DRB glavnog sustava tkivne podudarnosti**

Ukupno su dobiveni genotipovi lokusa DRB za 138 jedinki obične srne (prilog 1). Pronađeno je ukupno 10 alela (tablica 9) od kojih je jedan novootkriveni (Caca-DRB\*0405) i prijavljen je u GeneBank pod pristupnim brojem ON204042. Svi pronađeni aleli karakteristični su za običnu srnu i dosad nisu potvrđeni niti u jednoj drugoj vrsti. Duljina alela iznosila je 246 ili 249 pb, ovisno o prisutnosti delecije 168.-170. nukleotida koja je utvrđena u alelima Caca-DRB\*0301, Caca-DRB\*0302, Caca-DRB\*0303 i Caca-DRB\*0402 (slika 21). Aleli su translaterani u jedinstvene aminokiselinski slijedove, izuzev alela Caca-DRB\*0302 i Caca-DRB\*0402 koji kodiraju identičan aminokiselinski slijed. Prisutnost stop kodona ili promjena okvira čitanja nije utvrđena niti u jednom slijedu (slika 22).

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          10          20          30          40          50          60          70
Caca-DRB*0102 ATGTATACTA CGGGCGAGTG TCATTCTCC AACGGGACGG AGCGGGTGCG GTTCCTGGAC AGATACTTCT
Caca-DRB*0201 ..... A.....
Caca-DRB*0301 ..... A.....
Caca-DRB*0302 ..... A.AAA..... T.....
Caca-DRB*0304 ..... A.....
Caca-DRB*0303 ..... A.....
Caca-DRB*0402 ..... A.AAA..... T..... T.....
Caca-DRB*0401 ..... A.AAA..... T..... T.....
Caca-DRB*0403 ..... A.AAA..... T..... T.....
Caca-DRB*0405 ..... A.AAA..... T..... T.....

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          80          90          100          110          120          130          140
Caca-DRB*0102 ATAACGGAGA AGAGTTCGTG CGCTTCGACA GCGACTGGGG CGAGTACCGG GCGGTGACCG AGCTGGGGCG
Caca-DRB*0201 ..... A..... A.....
Caca-DRB*0301 ..... A.....
Caca-DRB*0302 ..... A.....
Caca-DRB*0304 ..... A..... A.....
Caca-DRB*0303 ..... A.....
Caca-DRB*0402 ..... A.....
Caca-DRB*0401 .....
Caca-DRB*0403 .....
Caca-DRB*0405 .....

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          150          160          170          180          190          200          210
Caca-DRB*0102 GCCGGTGGCC GAGGGCTGGA ACAGCCAGAA GGAGTTCCTG GAGCAGAGGC GGGCCGAGGT GGACACGTAC
Caca-DRB*0201 ... TCC... A..TA.....
Caca-DRB*0301 ... C.AC... A..TA.....
Caca-DRB*0302 ... C.AC... A..TA..... --- ..A..... G.G... C...
Caca-DRB*0304 ... TCC... A..TA..... ..A..... G.G... C...
Caca-DRB*0303 ... C.AC... A..TA..... --- ..A..... G.G... C...
Caca-DRB*0402 ... C.AC... A..TA..... --- ..A..... G.G... C...
Caca-DRB*0401 .....
Caca-DRB*0403 ... AC... A..TA..... G.G... C...
Caca-DRB*0405 ... AC... A..TA..... G.G... C...

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          220          230          240
Caca-DRB*0102 TGCAGACACA ACTACGGGGT CGGTGAGAGT TTCACTGTG
Caca-DRB*0201 .....
Caca-DRB*0301 ..... TAT.....
Caca-DRB*0302 ..... TAT.....
Caca-DRB*0304 ..... TAT.....
Caca-DRB*0303 .....
Caca-DRB*0402 ..... TAT.....
Caca-DRB*0401 .....
Caca-DRB*0403 .....
Caca-DRB*0405 ..... TAT.....

```

Slika 21. Nukleotidni sljedovi alela DRB pronađenih u istraženoj populaciji obične srne. Nukleotidi istovjetni onima u prvom redu prikazani su točkom (.). Povlakom (-) su označene delecije nukleotida. Preuzeto i prilagođeno iz Svetličić i sur. 2022.

	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
	10	20	30	40	50	60
CacaDRB*0102	MYTTGEC	HFS NGTER	VRFLD RYFY	NGEEFV RFDS	DWGEYR AVTEL	GRPVA EGWNS
CacaDRB*0201	.....S.....	.....	.....Y.S.....	.....	.....S.KY.....	.....
CacaDRB*0301	.....S.....	.....	.....Y.....	.....	.....D.KY.....	.....I.....
CacaDRB*0302	...KK..Y..	.....	.....Y.....	.....	.....D.KY.....	.....I.....
CacaDRB*0304	.....S.....	.....	.....Y.S.....	.....	.....S.KY.....	.....I.....
CacaDRB*0303	.....S.....	.....	.....Y.....	.....	.....D.KY.....	.....I.....
CacaDRB*0402	...KK..Y..	.....	.....Y.....	.....	.....D.KY.....	.....I.....
CacaDRB*0401	...KK..Y..	.....	.....	.....	.....	.....
CacaDRB*0403	...KK..Y..	.....	.....	.....	.....D.KY.....	.....
CacaDRB*0405	...KK..Y..	.....	.....	.....	.....D.KY.....	.....

	..... .....	..... .....	...
	70	80	
CacaDRB*0102	EQRRAE	VDTY CRH	NYGVGES FTV
CacaDRB*0201	.RG..A...	.....	.....
CacaDRB*0301	.RG..A...	.....I..	.....
CacaDRB*0302	.RG..A...	.....I..	.....
CacaDRB*0304	.....A...	.....I..	.....
CacaDRB*0303	.RG..A...	.....	.....
CacaDRB*0402	.RG..A...	.....I..	.....
CacaDRB*0401	.....	.....	.....
CacaDRB*0403	.RG..A...	.....	.....
CacaDRB*0405	.RG..A...	.....I..	.....

Slika 22. Aminokiselinski sljedovi alela DRB pronađenih u istraženoj populaciji obične srne. Aminokiseline istovjetne onima u prvom redu prikazane su točkom (.). Znakom - označene su delecije kodona, odnosno aminokiselinskog ostatka. Aminokiselinski sljedovi alela Caca-DRB\*0302 i Caca-DRB\*0402 identični su.

U ukupnom uzorku srna alel s najvećom frekvencijom je alel Caca-DRB\*0301 (39,5%), dok najmanju frekvenciju ima alel Caca-DRB\*0403 (0,7%). U homozigotnom obliku prisutna su samo četiri alela: Caca-DRB\*0102, Caca-DRB\*0201, Caca-DRB\*0301 i Caca-DRB \*0302, od kojih je u najvećem broju homozigotnih jedinki prisutan alel Caca-DRB\*0301 (21), a najmanjem alel Caca-DRB\*0102 (1) (tablica 9). Ukupno je među svim jedinkama utvrđeno 32 homozigota (23,2%) i 106 heterozigota (76,8%).



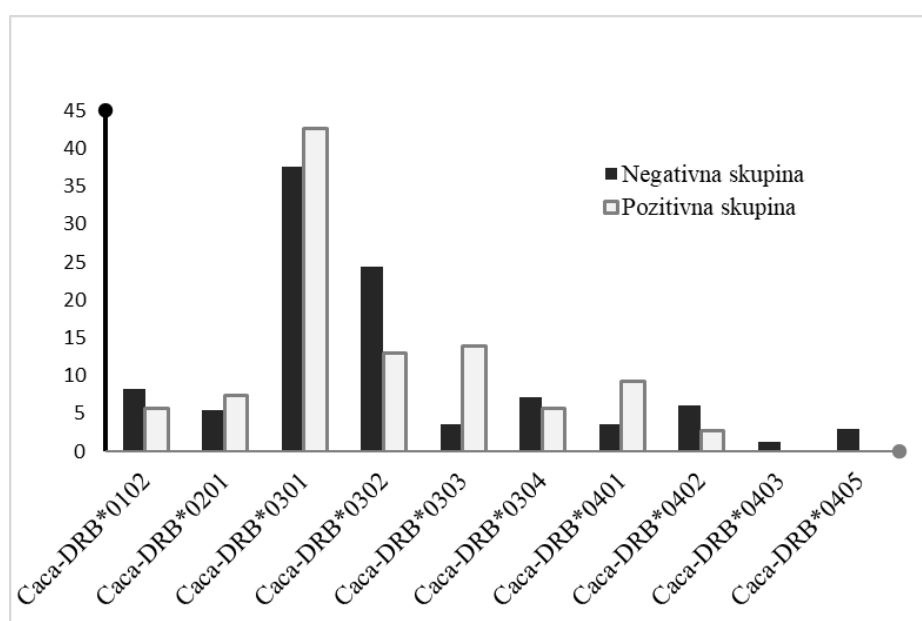
Tablica 9. Aleli lokusa DRB pronađeni u uzorku od 138 jedinki obične srne, broj nalaza i učestalost pojedinog alela, broj jedinki kod kojih je alel pronađen u homozigotnom i heterozigotnom obliku.

Alel	Broj nalaza (2N=276)	Učestalost (%)	Broj homozigota s alelom	Broj heterozigota s alelom
Caca-DRB*0102	20	7,2	1	18
Caca-DRB*0201	17	6,2	2	13
Caca-DRB*0301	109	39,5	21	67
Caca-DRB*0302	55	19,9	8	39
Caca-DRB*0303	21	7,6	0	21
Caca-DRB*0304	18	6,5	0	18
Caca-DRB*0401	16	5,8	0	16
Caca-DRB*0402	13	4,7	0	13
Caca-DRB*0403	2	0,7	0	2
Caca-DRB*0405	5	1,8	0	5

Nakon podjele ukupnog uzorka srna na skupinu iz područja s prisutnošću velikog američkog metilja (pozitivna skupina) i skupinu iz područja bez njegove prisutnosti (negativna skupina), u 84 jedinke negativne skupine srna pronađeno je svih 10 alela, dok je kod 54 jedinke pozitivne skupine pronađeno ukupno osam alela. Aleli Caca-DRB\*0403 i Caca-DRB\*0405 nisu utvrđeni među uzorcima pozitivnim na metilja (tablica 10, slika 23). Broj homozigotnih jedinki u negativnoj skupini uzoraka iznosio je 25 (29,8%), dok je u pozitivnoj skupini bilo sedam homozigotnih jedinki (13,0%). Alel s najvećom frekvencijom u obje skupine bio je Caca-DRB\*0301. Alel s drugom najvećom frekvencijom u negativnoj skupini bio je Caca-DRB\*0302, a u pozitivnoj Caca-DRB\*0303. Alel koji se pojavljuje s najmanjom frekvencijom u negativnoj skupini je Caca-DRB\*0403, dok je u pozitivnoj to Caca-DRB\*0402 (tablica 10, slika 24).

Tablica 10. Aleli Caca-DRB pronađeni u negativnoj i pozitivnoj skupini, broj nalaza i učestalost pojedinog alela.

Alel	Negativna skupina (N=84)		Pozitivna skupina (N=54)	
	Broj nalaza	Učestalost (%)	Broj nalaza	Učestalost (%)
Caca-DRB*0102	14	8,3	6	5,6
Caca-DRB*0201	9	5,4	8	7,4
Caca-DRB*0301	63	37,5	46	42,6
Caca-DRB*0302	41	24,4	14	13,0
Caca-DRB*0303	6	3,6	15	13,9
Caca-DRB*0304	12	7,1	6	5,6
Caca-DRB*0401	6	3,6	10	9,3
Caca-DRB*0402	10	6,0	3	2,8
Caca-DRB*0403	2	1,2	0	0,0
Caca-DRB*0405	5	3,0	0	0,0



Slika 23. Relativne učestalosti alela Caca-DRB unutar negativne skupine (N=84) i pozitivne skupine (N=54) s obzirom na prisutnost velikog američkog metilja u uzorkovanom području.

U čitavom setu podataka ukupno su pronađena 32 različita genotipa (tablica 11). Broj pronađenih genotipova iznosio je 28 kod negativne skupine uzoraka, dok je u pozitivnoj skupini pronađeno 17 genotipova. Petnaest genotipova je pronađeno samo u negativnoj skupini, četiri genotipa pronađeno samo u pozitivnoj skupini, dok je 13 broj genotipova pronađen u obje skupine uzoraka. U ukupnom setu uzoraka, najučestaliji genotip bio je homozigot za alel Caca-DRB\*0301 koji je pronađen kod 21 jedinke (15,2%). Ovaj genotip bio je najučestaliji i kod kontrolne (negativne) skupine gdje je pronađen kod 14 jedinki (16,7%), dok je u pozitivnoj skupini najučestaliji genotip bio Caca-DRB\*0301/\*0303, pronađen kod 9 jedinki (16,7%). Preostali homozigotni genotipovi imali su znatno niže učestalosti pa je idući najučestaliji homozigotni genotip u čitavom setu podataka Caca-DRB\*0302/\*0302 s frekvencijom od 5,8%. Učestalost preostalih homozigotnih genotipova u čitavom setu podataka otprilike je odgovarala učestalosti tih genotipova u negativnoj skupini, dok je u pozitivnoj skupini uzoraka genotip Caca-DRB\*0301/0301 predstavljao jedini homozigotni genotip, a preostalih 16 genotipova bili su heterozigoti.

Jedanaest genotipova pronađeno je samo jedanput u čitavom setu podataka, od toga su tri pojedinačna nalaza bila iz pozitivne skupine uzoraka, a osam pojedinačnih nalaza genotipova iz negativne skupine uzoraka.

Tablica 11. Broj nalaza i učestalost (Frekv.) 32 genotipa Caca-DRB pronađena u ukupnom setu uzoraka te u negativnoj i pozitivnoj skupini. Homozigotni genotipovi su podebljani. Najviše vrijednosti (ukupne i za svaku pojedinu skupinu) su podcrtane.

	Genotip (Caca-DRB)	Ukupno (N=138)		Negativna skupina (N=84)		Pozitivna skupina (N=54)	
		Broj nalaza	Frekv. (%)	Broj nalaza	Frekv. (%)	Broj nalaza	Frekv. (%)
1	<b>*0102/*0102</b>	1	0,7	1	1,2	0	0,0
2	*0102/*0201	1	0,7	0	0,0	1	1,9
3	*0102/*0301	9	6,5	4	4,8	5	9,3
4	*0102/*0302	4	2,9	4	4,8	0	0,0
5	*0102/*0402	1	0,7	1	1,2	0	0,0
6	*0102/*0403	2	1,4	2	2,4	0	0,0
7	*0102/*0405	1	0,7	1	1,2	0	0,0
8	<b>*0201/*0201</b>	2	1,4	2	2,4	0	0,0
9	*0201/*0301	6	4,3	3	3,6	3	5,6
10	*0201/*0302	1	0,7	0	0,0	1	1,9
11	*0201/*0303	2	1,4	0	0,0	2	3,7
12	*0201/*0304	2	1,4	1	1,2	1	1,9
13	*0201/*0401	1	0,7	1	1,2	0	0,0
14	<b>*0301/*0301</b>	21	<u>15,2</u>	14	<u>16,7</u>	7	13,0
15	*0301/*0302	20	14,5	13	15,5	7	13,0
16	*0301/*0303	11	8,0	2	2,4	9	<u>16,7</u>
17	*0301/*0304	9	6,5	6	7,1	3	5,6
18	*0301/*0401	8	5,8	3	3,6	5	9,3

Tablica 11. – nastavak

	Genotip (Caca-DRB)	Ukupno (N=138)		Negativna skupina (N=84)		Pozitivna skupina (N=54)	
		Broj nalaza	Frekv. (%)	Broj nalaza	Frekv. (%)	Broj nalaza	Frekv. (%)
19	*0301/*0402	2	1,4	2	2,4	0	0,0
20	*0301/*0405	2	1,4	2	2,4	0	0,0
21	<b>*0302/*0302</b>	8	5,8	8	9,5	0	0,0
22	*0302/*0303	2	1,4	1	1,2	1	1,9
23	*0302/*0304	2	1,4	2	2,4	0	0,0
24	*0302/*0401	3	2,2	1	1,2	2	3,7
25	*0302/*0402	7	5,1	4	4,8	3	5,6
26	*0303/*0304	2	1,4	1	1,2	1	1,9
27	*0303/*0401	3	2,2	1	1,2	2	3,7
28	*0303/*0402	1	0,7	1	1,2	0	0,0
29	*0304/*0401	1	0,7	0	0	1	1,9
30	*0304/*0402	1	0,7	1	1,2	0	0,0
31	*0304/*0405	1	0,7	1	1,2	0	0,0
32	*0402/*0405	1	0,7	1	1,2	0	0,0

Testom odstupanja od Hardy-Weinberg provedenom u programu Arlequin nije ustanovljeno statistički značajno odstupanje niti u jednoj skupini uzoraka (tablica 12). Ipak, najveća razlika između uočene heterozigotnosti ( $H_o$ ) i očekivane heterozigotnosti ( $H_e$ ) vidljiva je u pozitivnoj skupini uzoraka, gdje je utvrđena visoka uočena heterozigotnost (0,870) u odnosu na očekivanu (0,769). U čitavom uzorku i negativnoj skupini, vrijednosti očekivane heterozigotnosti bile su nešto manje od vrijednosti uočene heterozigotnosti (tablica 12).

Tablica 12. Rezultati testa odstupanja od Hardy-Weinberg ravnoteže (HWE): vrijednosti uočene heterozigotnosti ( $H_o$ ), očekivane heterozigotnosti ( $H_e$ ) i vjerojatnosti odstupanja od HWE ( $P_{HWE}$ ).

	$H_o$	$H_e$	$P_{HWE}$
Ukupno	0,761	0,778	0,167
Negativna skupina	0,702	0,782	0,116
Pozitivna skupina	0,870	0,769	0,511

#### 4.4. Indeksi genetičke raznolikosti lokusa DRB

U programu DNASp određen je broj segregirajućih (varijabilnih pozicija) koji je iznosio 22 (8,8%), uz deleciju jednog kodona. U istom programu izračunata je i vrijednost nukleotidne raznolikosti ( $\pi$ ) koja je iznosila 0,041 za sve pronađene alele te prosječni broj nukleotidnih razlika ( $k$ ) koji je iznosio 10,289 (tablica 13). Alelna bogatstvo izračunato u programu FSTAT iznosilo je 9,55 za čitav set podataka te 9,87 za skupinu negativnu na metilja. Iznos alelnog bogatstva u pozitivnoj skupini (8,00) ostao je nepromijenjen u odnosu na ukupni broj pronađenih alela u toj skupini jer su se ostale skupine podataka (svi uzorci i negativna skupina) proporcionalno sveli na broj uzoraka u pozitivnoj skupini ( $N=54$ ) (tablica 13). Pozitivni uzorci

imali su veću vrijednost  $k$  u odnosu na negativne uzorke. Nasuprot tomu, vrijednost alelnog bogatstva bila je veća za negativnu skupinu iako je broj uzoraka korigiran pomoću metode razrjeđivanja, kao i veći iznos nukleotidne raznolikosti  $\pi$ .

Tablica 13. Broj uzoraka ( $N$ ), broj alela ( $N_A$ ), broj varijabilnih nukleotidnih mjesta ( $S$ ), nukleotidna raznolikost ( $\pi$ ), prosječan broj nukleotidnih razlika među parovima alela ( $k$ ) i alelno bogatstvo procijenjeno prema broju uzoraka u najmanjoj (pozitivnoj) skupini uzoraka.

	$N$	$N_A$	$S$	$\pi$	$k$	Alelno bogatstvo
Ukupno	138	10	22 + 1 delecija	0,0418	10,289	9,55
Negativna skupina	84	10	22 + 1 delecija	0,0418	10,289	9,87
Pozitivna skupina	54	8	22+ 1 delecija	0,0441	10,857	8,00

U programu MEGA određene su vrijednosti nukleotidnih i aminokiselinskih evolucijskih udaljenosti između alela DRB. Za izračun evolucijskih udaljenosti korišteni su supstitucijski modeli s najmanjim BIC rezultatom, u slučaju nukleotidnih udaljenosti to su bili Tamura 3-parametar (T92) i Jukes-Cantor (JC) model supstitucije uz gama distribuciju, a kod izračuna aminokiselinskih udaljenosti najpogodniji model bio je Jones-Taylor-Thornton model aminokiselinske supstitucije, također uz gama distribuciju. Srednja vrijednost aminokiselinske udaljenosti bila je viša od srednje vrijednosti nukleotidne udaljenosti i kod pozitivne i negativne skupine. Pozitivna skupina imala je veće vrijednosti srednje nukleotidne (+19,4%) i srednje aminokiselinske udaljenosti (+34,3%) (tablica 14). Izračunate su i nukleotidne i aminokiselinske udaljenosti između parova pojedinih alela (tablica 15). Najveća nukleotidna udaljenost određena je između alela Caca-DRB\*0102 i Caca-DRB\*0402 (0,383), a najmanja između alela Caca-DRB\*0302 i Caca-DRB\*0402 (0,004). Najveća aminokiselina udaljenost bila je između alela Caca-DRB\*0102 i Caca-DRB\*0302/Caca-DRB\*0402 (1,480). Najmanja aminokiselinska udaljenost bila je između alela Caca-DRB\*0302 i Caca-DRB\*0402 s obzirom na to da kodiraju identičan aminokiselinski slijed (tablica 15).

Tablica 14. Srednje vrijednosti nukleotidnih i aminokiselinskih udaljenosti alela Caca-DRB i korišteni supstitucijski modeli. Standardne devijacije navedene su u zagradama.

	Nukleotidna udaljenost		Aminokiselinska udaljenost	
Ukupno (Negativna skupina)	T92 + G	0,108 (0,07)	JTT + G	0,411 (0,69)
Pozitivna skupina	JC + G	0,114 (0,06)	JTT + G	0,490 (0,95)

T92 – Tamura – 3 parametar model, JC- Jukes Cantor model, JTT - Jones-Taylor-Thornton model, G – gama distribucija



Tablica 15. Vrijednosti nukleotidne (ispod dijagonale) i aminokiselinske (iznad dijagonale) udaljenosti između parova svih pronađenih alela Caca-DRB. Najveće vrijednosti su podebljane, najmanje vrijednosti podcrtane.

	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.
1. Caca-DRB*0102		0,505	0,876	<b>1,480</b>	0,665	0,573	<b>1,480</b>	0,068	0,607	0,920
2. Caca-DRB*0201	0,111		0,150	0,370	0,121	0,074	0,370	0,846	0,187	0,307
3. Caca-DRB*0301	0,178	0,054		0,064	0,097	0,028	0,064	1,450	0,236	0,138
4. Caca-DRB*0302	0,322	0,108	0,021		0,264	0,131	<u>0,000</u>	0,703	0,089	0,037
5. Caca-DRB*0304	0,146	0,037	0,035	0,078		0,183	0,264	1,091	0,633	0,409
6. Caca-DRB*0303	0,110	0,029	0,015	0,046	0,066		0,131	0,963	0,138	0,236
7. Caca-DRB*0402	<b>0,383</b>	0,127	0,028	<u>0,004</u>	0,093	0,058		0,703	0,089	0,037
8. Caca-DRB*0401	0,037	0,205	0,322	0,177	0,262	0,203	0,149		0,267	0,431
9. Caca-DRB*0403	0,160	0,064	0,094	0,044	0,172	0,054	0,035	0,054		0,028
10. Caca-DRB*0405	0,260	0,106	0,054	0,021	0,106	0,094	0,015	0,095	0,015	

#### 4.5. Test AMOVA i genetička diferencijacija među skupinama

Rezultati analize molekularne varijance, odnosno testa AMOVA provedenog u programu Arlequin pokazali su da je je varijabilnost unutar pozitivne i negativne skupine uzoraka odgovorna za 98,65% ukupne varijabilnosti, dok je varijabilnost između skupina odgovorna za 1,35% ukupne varijabilnosti (tablica 16). Fiksacijski indeks  $F_{ST}$  izračunat uzimajući u obzir razlike između parova alela pojedinih skupina, iznosio je 0,014 uz p-vrijednost 0,01 što ga čini statistički značajnim ( $p < 0,05$ ).

Tablica 16. Rezultati testa AMOVA

Izvori varijabilnosti	Stupnjevi slobode	Suma kvadrata	Komponente varijance	Udio varijabilnosti (%)
Između skupina	1	1,09	0,053	1,35
Unutar skupina	274	106,45	0,389	98,65
Ukupno	275	107,54	0,394	100,00

#### 4.6. Selekcija i rekombinacija

Test homozigotnosti Ewans-Waterson i Slatkinov egzakti test upotrijebljeni su za procjenu djelovanja selekcije u nedavnoj povijesti na čitavom setu podataka, ali i na dvije zasebne skupine uzoraka (pozitivna i negativna). Ovi testovi implementirani u Alrequin uspoređuju uočene učestalosti alela s onim koji se očekuju pod djelovanjem Hardy-Weinberg ravnoteže (Ewens 1972; Watterson 1978; Slatkin 1996).

Rezultati na negativnoj i pozitivnoj skupini, kao i na ukupnom setu podataka, pokazali su smanjeni uočeni F u odnosu na očekivani (tablica 17) uz statističku podržanost Slatkinovog egzaktnog testa na razini  $p < 0,05$ . Ovi rezultati upućuju na djelovanje ravnotežne selekcije s obzirom na to da su vrijednosti F manje od 0,5 i vrijednost uočenog F je statistički značajno manja (Slatkinov test) od očekivane vrijednosti F, odnosno učestalosti alela su ravnomjernije raspoređene nego što se to očekuje u slučaju neutralnosti i usmjerene selekcije.

Tablica 17. Rezultati testa homozigotnosti Ewans-Waterson i Slatkinovog egzaktnog testa. Statistički značajne p vrijednosti su podcrtane.

	Negativna skupina	Pozitivna skupina	Ukupno (prosječno)	s.d.
Broj jedinki	84	54	138	
Broj alela	8	8	9	2,828
Uočeni F	0,222	0,239	0,230	0,051
Očekivani F	0,297	0,341	0,319	0,039
Watterson test	0,247	0,182	0,215	0,068
p (Slatkinov test)	<u>0,03</u>	<u>0,03</u>	<u>0,03</u>	0,01

F – homozigotnost, s.d. – standardna devijacija

U programu MEGA X prisutnost dugotrajne selekcije na čitavim sekvencama ispitana je Z testom selekcije i testom neutralnosti Tajima's D. Vjerojatnost odbacivanja nulte hipoteze ( $dN=dS$ ) u korist alternativne ( $dN>dS$ ) nije bila statistički značajna ( $p>0,05$ ) ni za alele pronađene isključivo u pozitivnoj skupini kao ni za one pronađene u obje skupine, odnosno u negativnoj skupini (tablica 18). Test Tajima's D ispituje potencijalno odstupanje od neutralnih očekivanja molekularne evolucije u populaciji konstantne veličine kroz usporedbu broja segregirajućih mjesta i prosječnog broja nukleotidnih razlika u pronađenim alelima. Vrijednost testa Tajima's D jednaka je nuli u slučaju neutralnosti, pozitivna u prisutnosti ravnotežne selekcije te negativna kod djelovanja purificirajuće, odnosno negativne selekcije (Tajima 1989). Rezultati Tajima's D statistike pokazali su pozitivnu vrijednost ukazujući tako na prisutnost ravnotežne selekcije (tablica 18).

Tablica 18. Rezultati Z testa selekcije i Tajima's D testa neutralnosti na alelima Caca-DRB pronađenih u negativnoj skupini (i ukupnom setu podataka) i pozitivnoj skupini.

	Z test selekcije					Tajima's D (MEGA)
	dN	dS	$\omega$ (dN/dS)	Z	p	
Ukupno (Negativna skupina)	0,04	0,04	1,00	0,19	0,43	1,527
Pozitivna skupina	0,05	0,04	1,25	0,33	0,37	1,463

dN – stopa nesinonimnih mutacija, dS-stopa sinonimnih mutacija

Prisutnost dugotrajne selekcije na pojedinačnim kodonima ispitana je u programu EasyCodeML, korištenjem modela M8. Nadalje, u programskom paketu HyPhy dostupnom na serveru Datamonkey upotrijebljene su metode FEL, FUBAR i MEME. Rezultati ovih testova pokazuju da je statistički značajno odstupanje od neutralnosti uočeno na tri kodona s barem dvije upotrijebljene metode (tablica 19). Najviše testova utvrdilo je djelovanje pozitivne selekcije na poziciji kodona 78 (M8, FEL, FUBAR, MEME), a najmanje na poziciji kodona 49 gdje je pozitivna selekcija potvrđena samo modelima M8 i MEME.

Tablica 19. Kodoni alela Caca-DRB koji su nakon testova provedenih u paketu HyPhy pokazali statistički podržano odstupanje od neutralnosti. Podebljani su ljudski kodoni koji su zaduženi za vezivanje antigena prema Brown i sur. (1993)

		MODEL			
Kodon (ljudski)	Kodon (srneći)	M8	FEL	FUBAR	MEME
<b>13</b>	5	X		X	X
57	49	X			X
<b>86</b>	78	X	X	X	X

FEL – Fixed Effect Likelihood, FUBAR - Fast Unconstrained Bayesian Approximation, MEME- Mixed Effects Model of Evolution

Testiranje rekombinacije na nukleotidnim slijedovima pronađenih alela provedeno je pomoću dva programa, HyPhy (metoda GARD) i RDP4. Metodom GARD je ispitano ukupno 458 različitih evolucijskih modela te je pronađena 21 potencijalna točka prijeloma. Potom je provedena daljnja analiza mogućih scenarija lokacija prijeloma. Rezultat analize sa scenarijem jedne točke prijeloma bila je nukleotidna pozicija 145, dok su u slučaju analize s dvije točke prijeloma najizglednije bile pozicije 85 i 196.

U programu RDP4 korištene su metode RDP, Geneconv, Chimera, MaxChi, BootScan, SiScan i 3Seq za prepoznavanje parentalnih sekvenci i njihovih rekombinantnih potomaka. S barem jednom metodom utvrđena su tri alela koja su potencijalno nastala rekombinacijom (aleli Caca-DRB\*0102, Caca-DRB\*0304 i Caca-DRB\*0401). No u obzir je uzet samo rekombinantni događaj na sekvenci alela Caca-DRB\*0401 koji je potvrđen s metodama MaxChi i Chimera (tablica 20).

Tablica 20. Potencijalni rekombinantni događaji na 10 alela Caca-DRB utvrđen programom RDP4. U zagradi je naznačena p-vrijednost pojedinog testa.

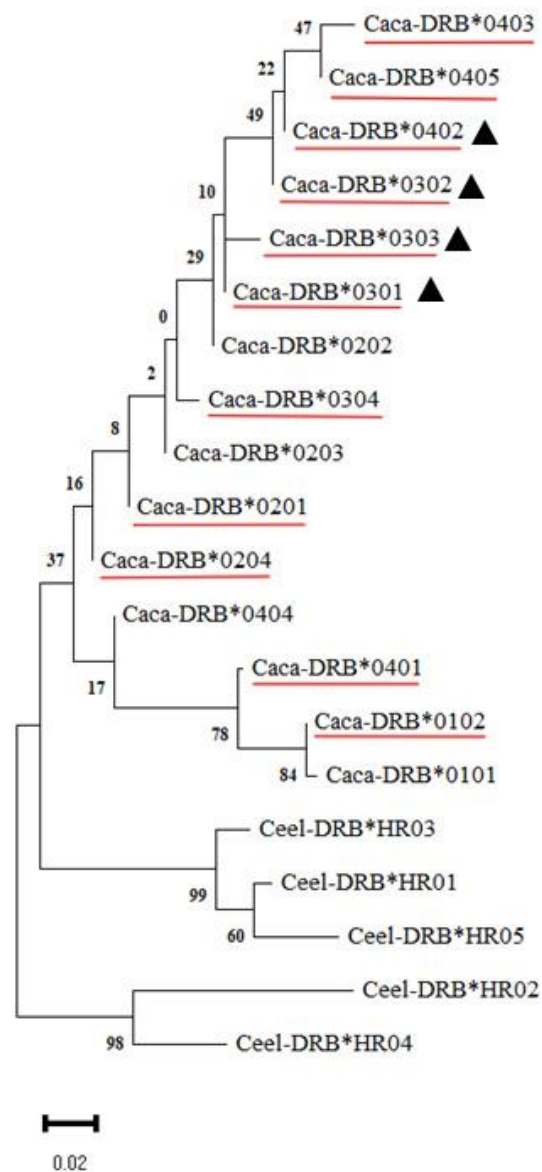
Rekombinantna sekvenca	Početna točka prekida	Završna točka prekida	Parentalne sekvence	Metode
Caca-DRB*0401	146	218	Caca-DRB*0403 / nepoznata	MaxChi (0,01), Chimaera (0,02)

#### 4.7. Evolucijski odnosi

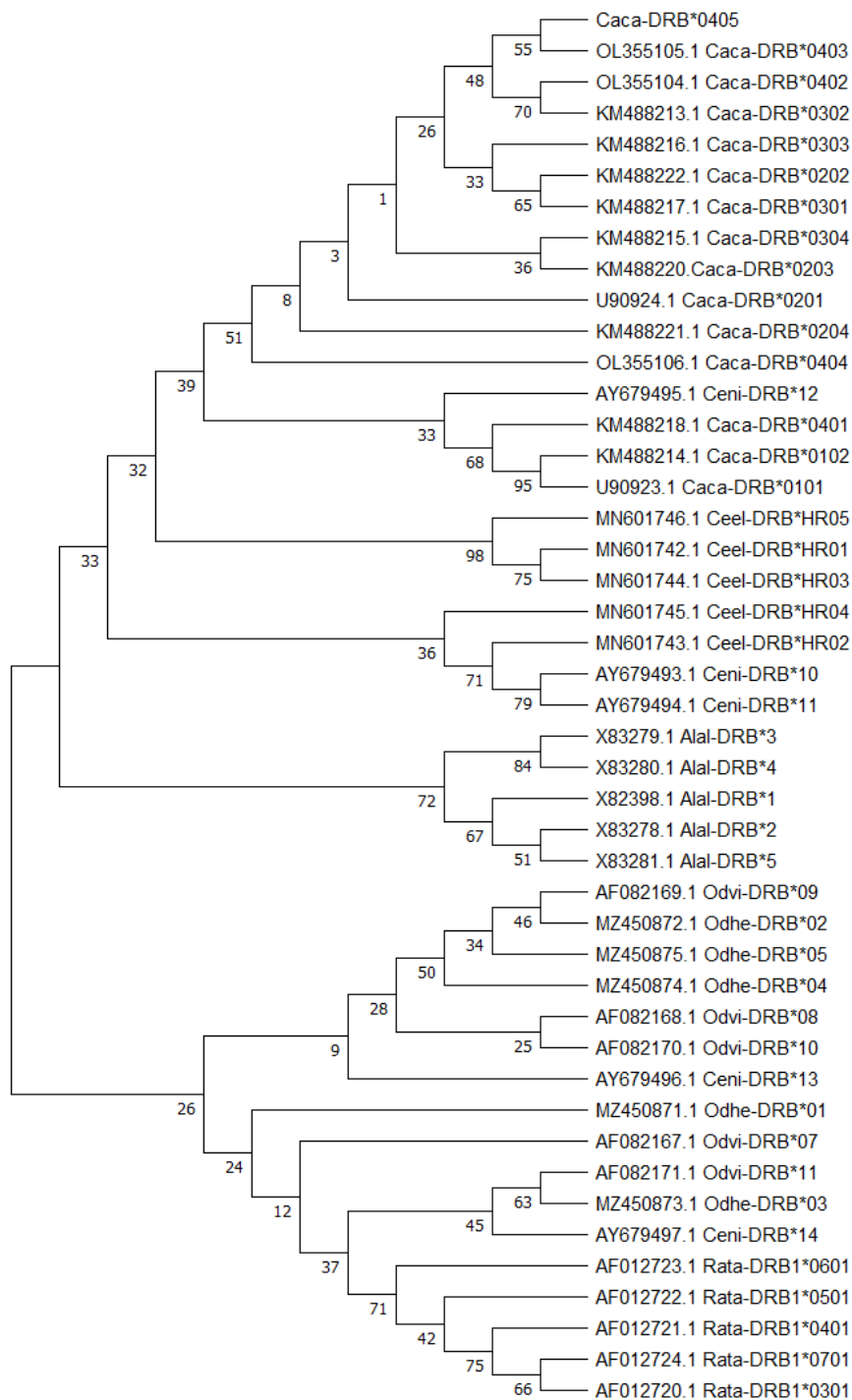
Prvo filogenetsko stablo alela lokusa DRB u obične srne konstruirano je pomoću programa MEGA X statističkom metodom ML uz primjenu supstitucijskog modela T92+G. Pritom je korišteno 10 alela obične srne koja su utvrđena u ovom istraživanju, pet dodatnih alela srne iz drugih istraživanja (Mikko i sur. 1999, Quéméré i sur. 2015, Bužan i sur. 2022) te pet alela Ceel-DRB običnog jelena iz istraživanja Bujanić i sur. (2020). Rezultati pokazuju da je većina grananja između srnećih alela podržana niskim bootstrap statističkim vrijednostima (0 – 49) uz nešto više vrijednosti odvajanja alela Caca-DRB\*0101 i \*0102 (84) i \*0401(78) (slika 24). Statistički je dobro podržano grananje koje odvaja alele jelena od alela srna. Aleli Caca-DRB\*0101, Caca-DRB \*0102, Caca-DRB \*0401 i Caca-DRB \*0404 pokazuju određenu razinu odvajanja od ostalih alela koji su blisko povezani, posebice aleli s delecijom kodona.

Drugo filogenetsko stablo također je konstruirano primjenom metode ML implementirane u program MEGA X, uz primjenu supstitucijskog modela JC + G. Ovo stablo konstruirano je kako bi se rasvijetlili evolucijski odnosi između alela DRB obične srne i alela drugih pripadnika porodice jelena (*Alces alces*, obični jelen *Cervus elaphus*, sika jelen *Cervus nippon*, bjelorepi jelen *Odocoileus virginianus*, prerijski bjelorepi jelen *Odocoileus hemionu*, karibu *Rangifer tarandus*). Pritom su korišteni svi dosad pronađeni aleli obične srne i po pet nasumično izabranih alela za svaku od drugih vrsta iz porodice jelena. Rezultati pokazuju da se većina alela pojedinih vrsta grupirala zasebno, uz iznimku alela bjelorepog jelena i prerijskog jelena, te alela sika jelena koji su na filogenetskom stablu prisutni uz alele prerijskog bjelorepog jelena, običnog jelena i obične srne. Vrijednosti *Bootstrap* nalaze se u intervalu 1 – 98, a najveću

vrijednost i ovdje pokazuje grananje koje odvaja alele običnog jelena s područja Hrvatske (Ceel-DRB\*HR01, \*HR03,\*HR05) od alela obične srne (98) (slika 25).



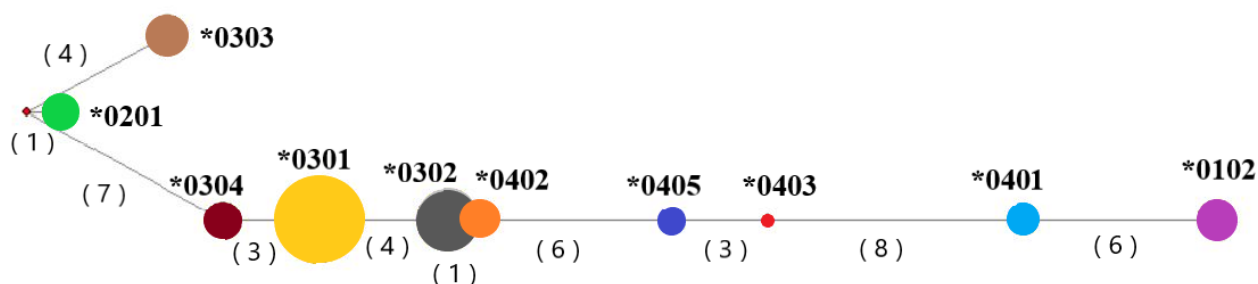
Slika 24. Filogenetsko stablo alela DRB obične srne (Caca) i običnog jelena (Ceel) dobiveno *Maximum likelihood* metodom uz primjenu T92 + G supstitucijskog modela i 1000 *Bootstrap* ponavljanja. Postotak dobivenih stabala kod kojih su aleli grupirani kako je prikazano nalazi se pokraj pripadajućih čvorova. Duljina grana odgovara broju supstitucija po nukleotidnoj poziciji. Crveno su podcrtani aleli otkriveni u ovom istraživanju. Trokutom su označeni aleli s delecijom kodona.



Slika 25. Filogenetsko stablo alela DRB obične srne (Caca), losa (Alal), običnog jelena (Ceel), sika jelena (Ceni), bjelorepog jelena (Odvi), pririjskog bjelorepog jelena (Odhe) i karibua (Rata) dobiveno *Maximum likelihood* metodom uz primjenu JC+ G supstitucijskog modela i 1000 *Bootstrap* ponavljanja. Uz nazive alela navedeni su i GenBank pristupni brojevi. Postotak dobivenih stabala kod kojih su aleli grupirani kako je prikazano nalazi se pokraj pripadajućih čvorova. Duljina grana odgovara broju supstitucija po nukleotidnoj poziciji.



Retikularna evolucija 10 utvrđenih alela obične srne istražena je pomoću MJ haplotipske mreže pokazala je da najveći broj mutacija koji odvaja pojedine alele je osam (Caca-DRB\*0201 i Caca-DRB\*0304, Caca-DRB\*0401 i Caca-DRB\*0403). Samo jednom mutacijom odvojeni su aleli Caca-DRB\*0302 i Caca-DRB\*0402 koji kodiraju za identičan aminokiselinski slijed (slika 26).



Slika 26. Median-joining haplotipska mreža 10 alela Caca-DRB utvrđena u ovom istraživanju. Veličina kruga proporcionalna je broju jedinki s pripadajućim alelom. Brojem u zagradi označen je broj mutacija između dva alela. Malim tamno crvenim kvadratom označen je hipotetski alel koji nedostaje.

#### 4.8. Povezanost alela Caca-DRB s prisutnošću velikog američkog metilja

Eventualna povezanost specifičnih alela DRB i prisutnosti velikog američkog metilja na određenom području testirana je dvjema varijantama Hi-kvadrat ( $\chi^2$ ) testa homogenosti. U prvoj varijanti testa svakom od 10 pronađenih alela pridružena je jedna pozicija u uređenoj 10-orci (tablica 21). Vrijednost test statistike bila je 41.445, ( $p=0.09956$ ). Za nivo značajnosti od alfa=0,05, s obzirom da je p-vrijednost veća od alfe, nije odbačena nulta hipoteza o homogenoj razdiobi alela unutar pozitivne i negativne skupine. Time je zaključeno da nema statističke

značajnosti na razini pojedinih genotipova, odnosno distribucije različitih alela u jedinki s obzirom na razdiobu između pozitivne i negativne skupine.

U drugoj varijanti testa provjerena je razdioba alela ne uzimajući u obzir kombinaciju različitih alela u jedinki već je određeno u koliko se uzoraka alel pojavljuje na bilo kojem od dva moguća mjesta, a u koliko se pojavljuje kao homozigot (dvaput u istoj jedinki) te su tako u obzir uzete samo učestalosti alela u pojedinim skupinama, a dobivene razdiobe brojeva provjerene su Hi-kvadrat testom. Statistički značajna razlika dobivena je kod sljedećih alela:

#### Alel Caca-DRB\*0302

Vrijednost test statistike je 6,2037, p-vrijednost testa je 0,04497. Za nivo značajnosti od  $\alpha=0,05$ , s obzirom da je p-vrijednost manja od alfe, odbacujemo nul hipotezu o jednakoj razdiobi ovog alela unutar ove dvije populacije. Alel je statistički značajno prisutniji u negativnoj skupini.

#### Alel Caca-DRB\*0303

Vrijednost test statistike je 9,3076, p-vrijednost testa je 0,002282. Za nivo značajnosti od  $\alpha=0,05$ , s obzirom da je p-vrijednost manja od alfe, odbacujemo nul hipotezu o jednakoj razdiobi ovog alela unutar ove dvije populacije. Alel je statistički značajno prisutniji u pozitivnoj skupini.

#### Aleli Caca-DRB\*0403 i Caca-DRB \*0405

S obzirom na to da su ovi aleli prisutni samo u negativnoj skupini, može se zaključiti da je i njihova distribucija u negativnoj korelaciji s prisutnošću velikog američkog metilja.

Tablica 21. Pozicija pridružena alelima Caca-DRB u uređenoj 10-torki za potrebe Hi-kvadrat statističkog testa.

<b>Pozicija</b>	<b>Alel</b>
1	Caca-DRB*0102
2	Caca-DRB*0201
3	Caca-DRB*0301
4	Caca-DRB*0302
5	Caca-DRB*0303
6	Caca-DRB*0304
7	Caca-DRB*0401
8	Caca-DRB*0402
9	Caca-DRB*0403
10	Caca-DRB*0405

## 5. RASPRAVA

Ovo je prvo istraživanje raznolikosti gena MHC obične srne (*C. capreolus*) u Republici Hrvatskoj i po mojem saznanju prvo istraživanje povezanosti alela MHC gena obične srne i invadiranosti parazitima u svijetu. U ovoj disertaciji parazitološkom pretragom jetara 138 jedinki obične srne potvrđeno je da je u vrijeme uzorkovanja invadirano područje s kojeg potječu uzorci bila samo Bjelovarsko-bilogorska županija, jer je između 54 pregledanih jetara s područja te županije, njih 25 bilo pozitivno na metilja. Preostalih 84 jetara iz drugih županija (Ličko-senjske, Međimurske, Primorsko-goranske i Zagrebačke županije) bilo je negativno na metilja.

Nakon sekvenciranja nekoliko uzoraka Sangerovom metodom, utvrđeno je da pojedini aleli imaju deleciju kodona zbog kojeg je genotipizacija heterozigotnih jedinki koje su posjedovale alele različite duljine bila onemogućena (slika 18). Iz tog razloga bilo je potrebno koristiti metodu sekvenciranja koja uključuje razdvajanje gametnih faza kao što je molekularno kloniranje ili sekvenciranje NGS. Kako bi uspostavili najoptimalniji protokol genotipizacije, testirane su i uspoređene tri različite metode genotipizacije: molekularno kloniranje korištenjem plazmidnog vektora, platforma Illumina MiSeq NGS i sustav Ion Torrent S5. S obzirom da su u ovom preliminarnom istraživanju svim trima metodama utvrđeni identični aleli u svakom uzorku (Svetličić i sur. 2022), platforma Illumina izabrana je za sekvenciranje preostalih uzoraka u ovom istraživanju zbog veće dosljednosti u broju očitavanja u usporedbi s platformom Ion Torrent (tablica 7, slika 20) te povoljnijeg omjera uloženog vremena i troškova u odnosu na molekularno kloniranje. Ovo istraživanje time je prvo koje koristi Illumina tehnologiju sekvenciranja za genotipizaciju gena MHC u obične srne, jer su u prethodnim istraživanjima korištene druge metode. Mikko i sur. (1999) koristili su kombinaciju molekularnog kloniranja i metode analize polimorfizma konformacije jednolančane DNA (engl. Single-strand conformation polymorphism, SSCP), Quémère i sur. (2015) upotrijebili su 454 tip sekvenciranja, dok su Bužan i sur. (2022) sekvencirali lokus DRB pomoću sustava Ion Torrent. S obzirom na to da je tehnologija Illumina trenutno dominantna tehnologija sekvenciranja NGS na tržištu, najprikladnije je razvijati metode genotipizacije koje se baziraju na ovom tipu sekvenciranja te će stoga protokol koji je upotrijebljen u ovom istraživanju poslužiti kao temelj genotipizaciji lokusa DRB obične srne u budućim istraživanjima.

Analizom 249 pb dugog odsječka eksona 2 lokusa DRB u 138 jedinki obične srne iz pet županija Republike Hrvatske pronađeno je ukupno 10 jedinstvenih alela. Maksimalni broj alela

nađen po uzorku iznosio je dva, u ovom istraživanju je potvrđeno da postoji samo jedan lokus DRB u obične srne u istraženim populacijama, odnosno da lokus DRB u obične srne nije dupliciran, kao što je to slučaj s nekim drugim srodnim vrstama, poput običnog jelena, gdje je potvrđeno postojanje od jednog do četiri lokusa (Swarbrick i sur. 1995; Fernández de mera i sur. 2009; Buczek i sur. 2016; Pérez-Espona i sur. 2019).

Broj pronađenih alela DRB, kao i vrijednosti drugih pokazatelja genetičkog polimorfizma (broj polimorfni mjesta, nukleotidna raznolikost, prosječan broj nukleotidnih razlika između parova alela, alelna bogatstvo) (tablica 13) ukazuju postojanje umjerene razine genetičke raznolikosti. Ovi rezultati u skladu su s prijašnjim istraživanjima lokusa DRB kod obične srne na francuskoj (Quéméré i sur. 2015) i slovenskoj populaciji (Bužan i sur. 2022). Deset jedinstvenih alela pronađeno je i u svakom od tih istraživanja, iako je broj analiziranih jedinki bio nešto veći u istraživanju Bužan i sur. (2022) (156 jedinki) i značajno veći u istraživanju Quéméré i sur. (2015) (476 jedinki). Devet od 10 alela pronađenih u ovom istraživanju u hrvatskoj populaciji je pronađeno i u slovenskoj populaciji (osim alela DRB\*0405), a sedam alela i u francuskoj populaciji (aleli Caca-DRB\*0102, Caca-DRB \*0201, Caca-DRB \*0301, Caca-DRB \*0302, Caca-DRB \*0303, Caca-DRB \*0304, Caca-DRB \*0401).

Sličnost hrvatske i slovenske populacije očitava se i u sličnim vrijednostima nukleotidne raznolikosti, prosječnog broja nukleotidnih razlika među parovima alelai identičnog broja polimorfni mjesta. Tako je nukleotidna raznolikost ( $\pi$ ) slovenske populacije iznosila 0,045, a hrvatske 0,042, prosječan broj nukleotidnih razlika među parovima alela ( $k$ ) kod slovenske populacije bio je 9,833, a hrvatske 10,289, dok je broj varijabilnih mjesta u obje populacije bio 22 uz dodatni indel jednog kodona. Također, najčešći aleli u slovenskoj populaciji također su bili Caca-DRB\*0301 i \*0302. Najistaknutija razlika između ova dva istraživanja je veći udio heterozigota u hrvatskoj populaciji (76,8% u odnosu na 54% u Bužan i sur. 2022). Visoka razina heterozigotnosti karakteristična je za gene MHC i u skladu je s hipotezom heterozigotne prednosti (Bernatchez i Landry 2003; Froeschke i Sommer 2005). Ipak, smanjeni udio heterozigotnih jedinki, kao u slučaju slovenske populacije, prethodno je utvrđen kod nekih vrsta porodice jelena kao što su bjelorepi jelen (*Odocoileus virginianus*) (Van Den Bussche i sur. 2002), karibu (*Rangifer tarandus*) (Gagnon i sur. 2020) i prerijski bjelorepi jelen (*Odocoileus hemionus*) (Cook i sur. 2022).

Testovi odstupanja od Hardy-Weinberg ravnoteže pokazali su visoke vrijednosti i uočene i očekivane heterozigotnosti, međutim statistički značajno odstupanje od Hardy-Weinberg ravnoteže nije dokazano pomoću ovog testa. Jedino je u pozitivnoj skupini određena viša vrijednost uočene heterozigotnosti (0,870) u odnosu na očekivanu (0,769) te je ta skupina općenito imala najveću vrijednost uočene heterozigotnosti (tablica 12). U ukupnom uzorku vrijednost očekivane heterozigotnosti bila je 0,778, što je nešto više od očekivane heterozigotnosti slovenske populacije koja je iznosila 0,739. Međutim, kako je ranije spomenuto, hrvatska populacija imala je značajno veći udio heterozigota, odnosno uočenu heterozigotnost. Statistički značajno odstupanje od Hardy-Weinberg ravnoteže često nije utvrđeno u istraživanjima gena MHC na divljim populacijama. Ravnotežna selekcija koja favorizira heterozigotnost ponekad se ne može uočiti unutar uzorkovane generacije jedinki ili nije izražena u svim generacijama i na svim područjima (Garrigan i Hedrick 2003). Također, premalen ili nereprezentativan uzorak može učiniti odstupanje od Hardy-Weinberg ravnoteže manje uočljivim (Apanius i sur. 1997).

U usporedbi s drugim pripadnicima porodice jelena (Cervidae), kod srna je ranije ustanovljena niža varijabilnost lokusa DRB (Mikko i sur. 1999; Quéméré i sur. 2015; Bužan i sur. 2022). Primjerice, kod svih dosadašnjih istraživanja lokusa DRB u običnog jelena (*Cervus elaphus*) utvrđen je veći broj alela u odnosu na ovo istraživanje (Swarbrick i sur. 1995; Fernández-de-Mera i sur. 2009; Buczek i sur. 2016; Pérez-Espona i sur. 2019; Bujanić i sur. 2020). Primjerice, Buczek i sur. (2016) pronašli su 46 alela u 155 jedinki jelena iz Poljske, Pérez-Espona i sur. u istraživanju na škotskoj populaciji utvrdili su 25 alela u 48 jedinki, a Bujanić i sur. (2020) na relativnom malom broju jedinki (23) iz Gorskog kotra pronašli su 23 alela. No pritom je važno ponovo naglasiti da jelen ima multiplicirani lokus DRB te zbog toga nije iznenađujuće da populacije ove vrste imaju veći broj alela lokusa DRB u odnosu na srne. Međutim, u istraživanjima na drugim pripadnicima porodice jelena, koji posjeduju samo jedan lokus DRB, također je utvrđen veći broj alela. Tako je u istraživanju Van Den Bussche i sur. (2002) na bjelorepom jelenu utvrđeno 18 alela kod 126 jedinki, u istraživanju Kennedy i sur. (2011) na aljaškom karibuu pronađen je 21 alel kod 114 jedinki, a kod patuljastog mošusnog jelena (*Moschus berezovskii*) sedam alela kod 52 jedinke (Cai i sur. 2015). Iznimku čini los (*Alces alces*) kod kojeg je ranije zabilježena niska razina MHC-DRB varijabilnosti, kako u europskim (Ellegren i sur. 1996) tako i sjevernoameričkim populacijama (Wilson i sur. 2003), što je objašnjeno kao posljedica naglog smanjenja populacije u prošlosti i specifičnih ekoloških

čimbenika te sjevernoeuropska populacija jelena lopatara kod kojeg je ustanovljen monomorfizam lokusa DRB (Mikko i sur. 1999).

Niža razina raznolikosti MHC zabilježena kod srna u odnosu na druge pripadnike porodice jelena potencijalno se može objasniti povijesnim smanjenjem populacije tijekom glacijalnih razdoblja. Tijekom zadnjeg glacijalnog ciklusa stanište obične srne bilo ograničeno na jug Europe (Mediterransko i Balkansko područje), a rekolonizacija središnje i sjeverne Europe najvjerojatnije je počela prije otprilike 15 000 godina (Lorenzini i Lovari 2006). Posljedica postojanja glacijalnog utočišta (refugij) i djelovanje genetičkog drifta moglo je rezultirati gubitkom genetičke raznolikosti na razini gena MHC (Mikko i sur. 1999; Radwan i sur. 2006; Bužan i sur. 2022). Quéméré i sur. (2015) utvrdili su kod obične srne visoku varijabilnost gena TLR (engl. Toll-like receptor), imunogenetičkih lokusa povezanih s urođenom imunosti, na razini usporedivoj s lokusom DRB. Poznato je da neke vrste nižu varijabilnost na lokusima MHC mogu nadomjestiti snažnim odgovorom urođene imunosti (Vinkler i Albrecht 2009 ; Heinrich i sur. 2017). Stoga je vrlo vjerojatno da urođena imunost ima važnu ulogu u održavanju imunogenetičke kompetentnosti populacija obične srne. Nadalje, s obzirom na to da se srne rijetko okupljaju u veća krda i teritorijalne su vrste, odnosno da život uglavnom provedu na teritoriju promjera 10 km (Janicki i sur. 2007), prijenos patogena je najvjerojatnije otežan, pa je time i selekcijski pritisak patogena smanjen.

Obrazac umjerene genetičke raznolikosti utvrđen na genima MHC obične srne u ovom i drugim istraživanjima, ponešto se razlikuju od rezultata istraživanja na neutralnim genetičkim markerima, koji su uglavnom potvrdili vrlo visoku razinu genetičke raznolikosti, kao i vrlo jasno izraženu strukturu populacije srna (Hartl i sur. 1991; Lorenzini i Lovari 2006; Barros i sur. 2020; Bužan i sur. 2022). U slučajevima kad se genetička strukturiranost populacije utvrđena na neutralnim lokusima ne uočava na adaptivnim lokusima, može se zaključiti da ravnotežna selekcija nadjačava neutralne genetičke sile kao što su genetički drift i migracija (Hedrick 1999). Ravnotežna selekcija održava velik broj alela u populaciji u ujednačenijim učestalostima nego što se to očekuje pod neutralnosti te na taj način povećava intrapopulacijsku genetičku raznolikost u odnosu na interpopulacijsku raznolikost (Bernatchez i Landry 2003). U skladu s time, test AMOVA proveden u ovom istraživanju pripisao je 98,65% ukupne varijabilnosti onoj unutar pozitivne i negativne skupine, a iznos fiksacijskog indeksa, koji označava mjeru diferencijacije skupina, bio je vrlo mali (0,014) (tablica 16).

Djelovanje pozitivne (ravnotežne) selekcije utvrđeno je i rezultatima testa Ewens-Watterson te pozitivnom vrijednosti Tajima's D (tablica 17). Test Ewens-Watterson također se temelji na pretpostavci da ravnotežna selekcija favorizira heterozigotne genotipove, te se pod djelovanjem takve selekcije očekuju ujednačenije učestalosti alela nego u slučaju neutralnosti. Stoga se efekt ravnotežne selekcije može utvrditi usporedbom uočene homozigotnosti, odnosno uočene raspodjele učestalosti alela s homozigotnosti koja se očekuje kod neutralnosti, izračunate na temelju Ewensove formule za uzorkovanje i Slatkinove korekcije (Ewens 1972; Slatkin 1996; Bernatchez i Landry 2003). Rezultati ovog testa ukazali su na djelovanje ravnotežne selekcije jer je smanjena homozigotnost utvrđena na obje populacije i čitavom setu podataka. Iako se smatra da ovaj test ima slabiju statističku snagu kod utvrđivanja selekcije (Arauco-Shapiro i sur. 2020), vrlo se često koristi (Bernatchez i Landry 2003) i njime je utvrđena ravnotežna selekcija primjerice na genima MHC kod lososa (Miller i sur. 2001), tetrijeba (Strand i sur. 2012) te kitova i dupina (Vassilakos i sur. 2009).

Prisutnost pozitivne selekcije potvrđena je i na pojedinačnim kodonima pomoću modela M8 u sklopu programa EasyCodeML te modelima FEL, FUBAR i MEME . Pristupima koji se temelje na kodonima, pozitivna selekcija je utvrđena na tri kodona (analogni kodonima 13, 57 i 86 kod ljudi) (Brown i sur. 1993) (tablica 19), koji su utvrđeni i u istraživanju Bužan i sur. (2022). U istraživanju Bužan i sur. utvrđeni su i dodatni kodoni na koje je djelovala pozitivna selekcija no u analizu su bili uključeni svi dotad pronađeni aleli obične srne, a ne isključivo oni pronađeni u tom istraživanju. Smatra se da pozitivna selekcija najviše djeluje na kodone koji kodiraju aminokiseline važne za vezanje antigena, odnosno na regiju PBD (Hughes i Nei 1988). U skladu s time, većina kodona koji su bili pod pozitivnom selekcijom na ljudskom lokusu DRB1, bili su dio regije PBD (Brown i sur. 1993). Nadalje, brojne druge vrste sisavaca dijele strukturu regije PBD s ljudskim analogom bez obzira na veliku varijabilnost lokusa DRB te je ustanovljeno da je proteinska struktura i funkcija vrlo konzervirana (Furlong i Yang 2008). Dva od tri kodona za koja je u ovom istraživanju potvrđeno djelovanje pozitivne selekcije slažu se s kodonima koji su dio regije PBD kod ljudi (kodoni 5 i 78 kod srna, odnosno kodoni 13 i 86 kod ljudi). Treći kodon za koji je ustanovljeno djelovanje pozitivne selekcije, kodon 49, analogan je kodonu 57 kod ljudi koji nije dio regije PBD, ali kodon 56 je dio te regije (Brown i sur. 1993). Ranije je utvrđeno da kodoni koji se nalaze neposredno pored kodona koji su dio regije PBD također često bivaju pod djelovanjem pozitivne selekcije (Furlong i Yang 2008).



Dosad je kod obične srne pronađeno ukupno 15 različitih alela DRB (Mikko i sur. 1999; Quéméré i sur. 2015; Bužan i sur. 2022), uključujući novi alel Caca-DRB\*0405, pronađen u ovom istraživanju. Najučestaliji alel u ovom istraživanju je Caca-DRB\*0301, što je vidljivo u čitavom setu podataka (39,5%) (tablica 9), kao i u negativnoj skupini (37,5%) i pozitivnoj skupini uzoraka (42,6%) (tablica 10). Homozigot za taj alel najučestaliji je genotip u čitavom setu podataka, kao i u negativnoj skupini što bi moglo upućivati na njegovu selektivnu prednost u povijesti populacija obične srne. Slična učestalost ovog genotipa (31%) utvrđena je i u slovenskoj populaciji.

Aleli lokusa DRB pronađeni u ovom istraživanju pokazuju veliku razinu prosječne međusobne aminokiselinske udaljenosti (41,1%), koja označava funkcionalnu raznolikost pronađenih alela kod istražene populacije. Ranije je prepoznato da se u slučajevima populacija s manjim brojem alela MHC, posebice onima koje su prošle efekt uskog grla, često radi o alelima koji su vrlo raznoliki (engl. divergent) (Hedrick i sur. 2000; Sommer 2003; Babik i sur. 2005). Ova pojava je u skladu s hipotezom da jedinke koje imaju mogućnost ekspresije raznolikih alela MHC posjeduju selektivnu prednost jer se na taj način mogu obraniti od šireg spektra patogena (Wakeland i sur. 1990).

U četiri alela (Caca-DRB\*0301, Caca-DRB\*0302, Caca-DRB\*0303 i Caca-DRB\*0402) utvrđena je delecija jednog nukleotida, na aminokiselinskoj poziciji 57 koja odgovara kodonu 65 kod ljudi (Brown i sur. 1993). Ova delecija utvrđena je i na lokusima DRB3 (Mikko i Anderson 1995) i DQB3 (Sigurdardóttir i sur. 1992) kod goveda, lokusu DRB3 europskog bizona (Radwan i sur. 2006), na jednom alelu lokusa DRB mošusnog jelena (Cai i sur. 2015), a primijećena je i na alelima MHC IIB štakora i miša (Lenz i sur. 2009). Kodon 65 inače kodira za aminokiselinski ostatak lanca  $\alpha$  molekule MHC te delecija ovog kodona najvjerojatnije utječe na vezanje antigena (Mikko i sur. 1997). Filogenetskom analizom u istraživanju Mikko i sur. (1997) utvrđeno je da aleli s delecijom kod goveda i srna nisu rezultat zajedničkog porijekla cjelokupne alelne linije s delecijom kodona 65, već da je delecija nastala paralelno u evolucijskoj povijesti (konvergentna evolucija) ili da ove vrste dijele tek manji ancestralni dio koji uključuje deleciju. Pritom su se svi srneći aleli grupirali bliže jedni drugima nego goveđim alelima sa ili bez delecije. Ipak, pokazalo se da su srneći aleli s delecijom sličniji goveđim alelima s delecijom nego onima bez delecije (Mikko i sur. 1997). Prirodna selekcija očigledno tolerira ili donekle čak i favorizira ovu deleciju, posebice jer je sadržavaju najučestaliji aleli utvrđeni u sadašnjem istraživanju. U skladu s time, jedan od goveđih alela s

delecijom: BoLA-DRB3\*0201 jedan je od najčešćih alela DRB kod europskih pasmina goveda (Mikko i sur. 1997). Međutim, delecija kodona 65 zasad nije utvrđena kod drugih vrsta divljih preživača, što upućuje na to da je, ukoliko potječe iz razdoblja prije razdvajanja bovida i cervida, u tim vrstama izgubljena ili je prisutna u izrazito niskoj učestalosti. Aleli MHC i alelne linije opstaju milijunima godina te kao takvi mogu ostati nepromijenjeni otprije specijacije, odnosno razdvajanja vrsta (Klein i sur. 1998). Transspecijski polimorfizam na razini čitavih alela nije utvrđen u ovom istraživanju, kao ni u prijašnjim istraživanjima gena MHC kod srne (Mikko i sur. 1999; Quéméré i sur. 2015; Bužan i sur. 2022), iako je dijeljenje alela unutar različitih vrsta cervida dokumentirano vrlo često, primjerice između vrsta sika jelen i obični jelen (Li i sur. 2013), bjelorepi jelen i prerijski jelen (Cook i sur. 2022). Stoga je kod srne pojava transspecijskog polimorfizma naizgled ograničena na segmente unutar alela, a ne obuhvaća potpuno dijeljenje alela između različitih vrsta.

Evolucijski odnosi između alela srne, kao i alela drugih pripadnika porodice jelena ispitani su konstrukcijom filogenetskog stabla ML u programu MEGA. U prvom filogenetskom stablu (slika 24) grananja između alela srne bila su podržana niskom statističkom vjerojatnosti, uz iznimku tri alela (Caca-DRB\*0101, Caca-DRB\*0102 i Caca-DRB\*0401), ali su aleli jelena bili grupirani zasebno uz visoku statističku podržanost (99). U drugom filogenetskom stablu (slika 25), osim alela obične srne, uključeni su i aleli soba, običnog jelena, sika jelena, bjelorepog jelena, prerijskog bjelorepog jelena i karibua. Većina alela pojedine vrste grupirala se zasebno. Ipak, aleli bjelorepog jelena i prerijskog jelena, te alela sika jelena i običnog jelena bili su u istoj skupini što nije toliko iznenađujuće s obzirom na to da pripadaju istim rodovima (bjelorepi jelen i prerijski jelen rodu *Odocoileus*, obični jelen i sika jelen rodu *Cervus*) te je veća vjerojatnost da će djeliti dijelove alela, odnosno veća je vjerojatnost pojave transspecijskog polimorfizma. No, zanimljivo je da su se aleli sika jelena grupirali i s alelima bjelorepog i prerijskog jelena, ali i s alelima obične srne. Ovi rezultati potvrđuju širu prisutnost obilježja transspecijskog polimorfizma. U filogenetskoj analizi u istraživanju Cook i sur. (2022), aleli obične srne također su bili u grupi s alelima sika jelena, ali i bliski alelima običnog jelena i bjelorepog jelena. U filogenetskoj analizi koju su proveli Cook i sur. (2022) odvajanja alela pojedinih vrsta bila su manje izražena nego u ovom istraživanju, osim odvajanja alela losa i karibua u zasebne grupe. Zasebna grupiranja losa i karibua možda se mogu objasniti time što u sjevernim područjima gdje ove vrste obitavaju, specifični okolišni čimbenici kao što su hladna klima i manja dostupnost hrane, utječu na broj i raznolikost parazita i posljedično njihovog selekcijskog pritiska koji determinira obrazac varijabilnosti MHC.

Paraziti predstavljaju ozbiljnu prijetnju na koju se divlje populacije moraju prilagoditi u što kraćem vremenskom razdoblju zbog njihove izrazito visoke stope evolucije (Ebert i Fields 2020). Prilagodbe na parazitski pritisak najčešće su dokumentirane kod laboratorijskih istraživanja (Eizaguirre i sur. 2012; Phillips i sur. 2018), dok su istraživanja dinamike mnogo složenije interakcije između nositelja i parazita u divljini relativno rijetke. U ovom istraživanju, istražen je utjecaj nezavičajnog nametnika velikog američkog metilja na gene MHC u obične srne. Prikupljeni uzorci srna podijeljeni su u dvije skupine prema prisutnosti metilja na području na kojem su jedinke srna obitavale. S obzirom na činjenicu da veliki američki metilj nezavičajni nametnik i njegovo prisustvo je na području Republike Hrvatske ograničeno, primjenom istraživanja tipa „slučaj-kontrola“ uspoređeni su obrasci genetičke raznolikosti između pozitivne skupine (skupina slučaj), gdje je pretpostavljen selekcijski pritisak metilja na čitavu populaciju, i negativne skupine (skupine kontrola) u kojoj jedinke, kao i njihove roditeljske generacije nisu bile u kontaktu s metiljem te tako ni pod selekcijskim pritiskom ovog nametnika. Indeksi genetičke raznolikosti uglavnom su bili nešto viših vrijednosti kod pozitivne skupine, uključujući iznose nukleotidne raznolikosti (0,0441 kod pozitivne skupine i 0,418 kod negativne skupine), prosječnog broja nukleotidnih razlika među parovima alela (10,857 kod pozitivne skupine i 10,289 kod negativne) te nukleotidne i aminokiselinske udaljenosti (0,114 i 0,490 kod pozitivne skupine i 0,108 i 0,411 kod negativne), kao i već ranije spomenuti iznosi uočene i očekivane heterozigotnosti. Nasuprot tomu, alelna bogatstvo bilo je manje u pozitivnoj skupini u odnosu na negativnu (8,00 i 9,87).

Primjenom Hi-kvadrat testa zabilježena je statistički značajno veća učestalost alela Caca-DRB\*0302 u negativnoj skupini ( $p=0,04497$ ). Aleli Caca-DRB\*0403 i Caca-DRB\*0405 bili su prisutni samo u negativnoj skupini i to u vrlo niskim učestalostima (tablica 10, slika 23). Ovi aleli nisu pronađeni u Francuskoj. Nasuprot tomu, alel Caca-DRB\*0403 bio je vrlo čest u Sloveniji te je pronađen u osam od deset populacija rasprostranjenih širom zemlje (Bužan i sur. 2022). Postoji mogućnost da aleli Caca-DRB\*0403 i Caca-DRB\*0405 nisu prisutni u pozitivnoj skupini jer doprinose prijemljivosti fasciloidozi te su pod utjecajem negativne selekcije. Međutim, ovi aleli nađeni su u negativnoj skupini u vrlo niskoj učestalosti pa postoji mogućnost da nisu nađeni zbog slučajnosti jer je broj uzoraka u pozitivnoj skupini bio manji od onog u negativnoj. Povećanjem broja uzoraka u pozitivnoj i negativnoj skupini na otprilike 100, vjerojatno bi mogli odbaciti mogućnost da se radi o slučajnosti.

S druge strane, alel Caca-DRB\*0303 bio je statistički značajno ( $p=0,002282$ ) prisutniji u pozitivnoj skupini prema rezultatima Hi-kvadrat testa. Alel Caca-DRB\*0303 u negativnoj

skupini ima je učestalost od 3,6%, a u pozitivnoj skupini imao je učestalost 13,9% (tablica 10). Ovaj alel ranije je pronađen u francuskoj i slovenskoj populaciji srne (Quéméré i sur. 2015; Bužan i sur. 2022) u kojima zasad nema fascioloidoze. Zanimljivo je da je u Sloveniji utvrđen samo u dvije od deset populacija no u jednoj od njih (jugozapadnoj) bio je najprevalentniji alel prisutan u velikoj učestalosti. Ovi rezultati demonstriraju mogućnost da alel Caca-DRB\*0303 predstavlja primjer rijetkog alela vezanog uz mehanizam selekcije ovisne o negativnoj učestalosti (Slade i McCallum 1992). Prirodna selekcija održava ovakve alele niske učestalosti u populaciji, a u slučaju pojave novog patogena ovi aleli donose otpornost te im se stoga učestalost u populaciji povećava jer donose selektivnu prednost.

Promjene u odnosu nositelj-parazit na primjeru obične srne neupitno su vidljive na makroskopskoj razini, od činjenice da se za srnu kao aberantnog nositelja smatralo kako ne može pokazivati znakove kronične invazije, odnosno stvoriti pseudociste niti izlučivati jajašca, što je dovodilo do nesazrijevanja metilja i njegovog neograničenog migriranja po jetri (Králová-Hromadová i sur. 2016). Takve migracije dovodile su do uginuća srne uzrokovanih već jednim metiljem. Protokom određenog razdoblja međusobnog suživota dolazi do utvrđivanja prvih pseudocista u jetrima srna (Demiaszkiewicz i sur. 2018) i do prvih nalaza kroničnih invazija, odnosno sposobnosti srne ne samo da formira pseudocistu, već i da preživi prvu invaziju i bude ponovno invadirana novim metiljima (Konjević i sur. 2021). Ovaj nalaz, kao dodatni pokazatelj prilagodbe utvrdili su Filip-Hutsch i sur. (2022).

Na molekularnoj razini u ovom je istraživanju potvrđena statistički značajno viša učestalost alela Caca-DRB\*0303 u pozitivnoj skupini, kao i viši udio heterozigotnosti, što potencijalno ukazuje na moguće prilagodbe na nivou gena MHC. Kako bi se potvrdila ova pretpostavka potrebna su daljnja istraživanja na srnama koje su preživjele invaziju (stvorile pseudociste) s obzirom na to da je ova pojava u trenutku izrade ove disertacije još uvijek bila razmjerno rijetka, iako su već zamijećene i blaže promjene na invadiranim jetrima. Upravo je zbog ograničene varijabilnosti gena MHC u srne te zbog rijetke invadiranosti i činjenice da dobar dio srna nije bio sposoban preživjeti invaziju ovo je istraživanje bilo značajno teže za provesti negoli na primjeru tipičnih konačnih nositelja kao što je primjerice obični jelen. Istraživanja na lokusima urođene imunosti, kao što su primjerice receptori TLR možda će u budućnosti doprinijeti novim spoznajama. Pored toga, u budućim istraživanjima bilo bi zanimljivo ispitati i prilagodbe na nivou genotipa samoga metilja, s obzirom da je neupitno da i u njih dolazi do prilagodbi s ciljem preživljavanja i nastavka životnog ciklusa.

## 6. ZAKLJUČCI

Potvrđena je prisutnost velikog američkog metilja u Bjelovarsko-bilogorskoj županiji, te nije potvrđena njegova prisutnost na odabranim područjima iz ovog istraživanja (Ličko-senjske, Međimurske, Primorsko-goranske i Zagrebačke županije).

Nakon usporedbe rezultata sekvenciranja lokusa DRB u obične srne pomoću tri različite metode, platforma Illumina izabrana je kao najoptimalnija zbog dosljednosti u broju očitavanja te povoljnijeg omjera uloženog vremena i troškova u odnosu na molekularno kloniranje.

U ovom istraživanju je potvrđeno postojanje samo jednog lokusa DRB u populacijama obične srne, odnosno lokus DRB nije dupliciran kao što je to slučaj kod nekih drugih vrsta porodice jelena.

Analizom eksona 2 lokusa DRB kod 138 jedinki obične srne iz Republike Hrvatske utvrđeno je 10 jedinstvenih alela. Alel Caca-DRB\*0405 otkriven je po prvi put te je prijavljen u GeneBank. Svi pronađeni aleli karakteristični su za običnu srnu i dosad nisu potvrđeni niti u jednoj drugoj vrsti. Duljina pronađenih alela iznosila je 246 ili 249 pb, ovisno o prisutnosti delecije koja je utvrđena u alelima Caca-DRB\*0301, Caca-DRB\*0302, Caca-DRB\*0303 i Caca-DRB\*0402.

Broj utvrđenih alela, kao i indeksi genetičke raznolikosti impliciraju umjerene razine genetičke raznolikosti kod hrvatske populacije obične srne, što je u skladu s dosadašnjim istraživanjima na drugim populacijama ove vrste. Aminokiselinske udaljenosti između utvrđenih alela vrlo su visoke i potvrđuju mogućnost prepoznavanja širokog spektra antigena.

Statistički značajno odstupanje od Hardy-Weinberg ravnoteže nije potvrđeno u ovom istraživanju, ali učestalost heterozigota bila je vrlo visoka u obje skupine uzoraka i u čitavom setu podataka što je karakteristika „heterozigotne prednosti“, pretpostavljenog mehanizma ravnotežne selekcije na genima MHC.

Postojanje genetičke strukture nije potvrđeno korištenjem testa AMOVA testa također može ukazivati na prisutnost ravnotežne selekcije koja nadjačava neutralne evolucijske sile. Djelovanje prirodne selekcije potvrđeno je različitim testovima, na čitavom nukleotidnom slijedu i pojedinačnim kodonima.

Alel Caca-DRB\*0303 statistički je značajno prisutniji ( $p < 0,01$ ) u pozitivnoj skupini što ukazuje na mogućnost njegovog selektivnog značaja za otpornost na fascioloidozu i početak prilagodbe obične srne na nezavičajnog metilja koja je prethodno utvrđena na makroskopskom nivou.

## 7. LITERATURA

- Abraham, J., Barker, D., Robinson, J., Maccari, G., Marsh, S. (2018). The IPD Databases: Cataloguing and understanding allele variants. *Methods in molecular biology* 1802, 31–48.
- Andersen, R. (2000). The European roe deer: The biology of success. Scandinavian University Press. Oslo, Norway.
- Andreis, I., Čulo, F., Marušić, M., Taradi, M. (1998). Imunologija. Školska knjiga. Zagreb, Croatia.
- Angles, J., Kennedy, L., Pedersen, N. C. (2005). Frequency and distribution of alleles of canine MHC-II DLA-DQB1, DLA-DQA1 and DLA-DRB1 in 25 representative American Kennel Club breeds. *Tissue Antigens*, 66, 173–184.
- Apanius V., Penn D., Slev P.R., Ruff L.R., Potts W.K. (1997) The nature of selection on the major histocompatibility complex. *Critical Reviews in Immunology* 17, 179–224.
- Apollonio, M., Anderson, R., Putman, R. (2010). European ungulates and their management in the 21st Century. Cambridge University Press. London, United Kingdom.
- Apollonio, M., Belkin, V., Borkowski, J., Borodin, O., Borowik, T., Cagnacci, F., Alexey, D., Danilov, P., Faybich, A., Ferretti, F., Gaillard, J.-M., Hayward, M., Heshtaut, P., Heurich, M., Hurynovich, A., Kashtalian, A., Kerley, G., Kjellander, P., Kowalczyk, R., Yanuta, G. (2017). Challenges and science-based implications for modern management and conservation of European ungulate populations. *Mammal Research*, 62, 209–217.
- Arauco-Shapiro, G., Schumacher, K. I., Boersma, D., Bouzat, J. L. (2020). The role of demographic history and selection in shaping genetic diversity of the Galápagos penguin (*Spheniscus mendiculus*). *PLOS ONE*, 15(1), e0226439.
- Axtner, J., i Sommer, S. (2012). The functional importance of sequence versus expression variability of MHC alleles in parasite resistance. *Genetica*, 140(10–12), 407–420.
- Babik, W. (2010). Methods for MHC genotyping in non-model vertebrates. *Molecular Ecology Resources*, 10(2), 237–251.
- Babik, W., Durka, W., Radwan, J. (2005). Sequence diversity of the MHC DRB gene in the Eurasian beaver (*Castor fiber*). *Molecular Ecology*, 14(14), 4249–4257.
- Baker, K. H., Rus Hoelzel, A. (2013). Evolution of population genetic structure of the British roe deer by natural and anthropogenic processes (*Capreolus capreolus*). *Ecology and Evolution*, 3(1), 89–102.
- Balbo, T., Lanfranchi, P., Rossi, L., Meneguz, P. G. (1987). Health management of a red deer population infected by *Fascioloides magna* (Bassi 1975). *Annali Della Facolta Di Medicina Veterinaria Di Torino*.

- Bandelt, H. J., Forster, P., Röhl, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16(1), 37–48.
- Barros, T., Ferreira, E., Rocha, R. G., Brotas, G., Carranza, J., Fonseca, C., Torres, R. T. (2020). The Multiple origins of roe deer populations in Western Iberia and their relevance for conservation. *Animals*, 10(12), 2419.
- Bassi, R. (1875). Sulla cachessia ittero-verminosa, o marciaia, causata dei Cervi, causata dal *Distomum magnum*. *Il Medico Veterinario*, 4, 497–515.
- Behl, J. D., Verma, N. K., Tyagi, N., Mishra, P., Behl, R., Joshi, B. K. (2012). The major histocompatibility complex in bovines: A review. *ISRN Veterinary Science*, 2012, 1-12.
- Bentley, D. R., Balasubramanian, S., Swerdlow, H. P., Smith, G. P., Milton, J., Brown, C. G., Hall, K. P., Evers, D. J., Barnes, C. L., Bignell, H. R., Boutell, J. M., Bryant, J., Carter, R. J., Keira Cheetham, R., Cox, A. J., Ellis, D. J., Flatbush, M. R., Gormley, N. A., Humphray, S. J., ...Smith, A. J. (2008). Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature*, 456(7218), 53–59.
- Bernatchez, L., Landry, C. (2003). MHC studies in nonmodel vertebrates: What have we learned about natural selection in 15 years? *Journal of Evolutionary Biology*, 16(3), 363–377.
- Borghans, J. A. M., Beltman, J. B., De Boer, R. J. (2004). MHC polymorphism under host-pathogen coevolution. *Immunogenetics*, 55(11), 732–739.
- Brooke, V. (1878). On the classification of the Cervidae, with a synopsis of the existing species. *Proceedings of the Zoological Society of London*, 46(1), 883–928.
- Brown, J. H., Jardetzky, T. S., Gorga, J. C., Stern, L. J., Urban, R. G., Strominger, J. L., Wiley, D. C. (1993). Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature*, 364(6432), 6432.
- Buczek, M., Okarma, H., Demiaszkiewicz, A. W., Radwan, J. (2016). MHC, parasites and antler development in red deer: No support for the Hamilton & Zuk hypothesis. *Journal of Evolutionary Biology*, 29(3), 617–632.
- Bujanić, M., Buzan, E., Galov, A., Arbanasić, H., Potušek, S., Stipoljev, S., Šprem, N., Križanović, K., Konjević, D., Bujanić, M., Bužan, E., Galov, A., Arbanasić, H., Potušek, S., Stipoljev, S., Šprem, N., Križanović, K., Konjević, D. (2020). Variability of the DRB locus of MHC genes class II in red deer (*Cervus elaphus*) from a mountain region of Croatia. *Veterinarski Arhiv*, 90, 385–392.
- Bujanić, M., Lukač, M., Erman, V., Gudan Kurilj, A., Janicki, Z., Konjević, D. (2019). Fatalna invazija srne obične metiljem *Fascioloides magna*. *Zbornik radova Veterinarski dani 2019*.
- Bujanić, M., Martinković, F., Živičnjak, T., Lučinger, S., Sindičić, M., Severin, K., Krapinec, K., Konjević, D. (2016). Prikaz nalaza parazitološke pretrage probavnog sustava srne obične (*Capreolus capreolus* L.). *Zbornik sažetaka Priroda i divljač, izazovi lovstva u 21. stoljeću*.

- Burbaitė, L., Csányi, S. (2010). Red deer population and harvest changes in Europe. *Acta Zoologica Lituanica*, 20(4), 179–188.
- Burke, M. G., Stone, R. T., Muggli-Cockett, N. E. (1991). Nucleotide sequence and northern analysis of a bovine major histocompatibility class II DR beta-like cDNA. *Animal Genetics*, 22(4), 343–352.
- Bužan, E., Potušek, S., Duniš, L., Pokorný, B. (2022). Neutral and selective processes shape MHC diversity in roe deer in Slovenia. *Animals*, 12(6), 723.
- Cai, R., Shafer, A. B. A., Laguardia, A., Lin, Z., Liu, S., Hu, D. (2015). Recombination and selection in the major histocompatibility complex of the endangered forest musk deer (*Moschus berezovskii*). *Scientific Reports*, 5(1), 1-8.
- Catchpole, B., Kennedy, L. J., Davison, L. J., Ollier, W. E. R. (2008). Canine diabetes mellitus: From phenotype to genotype. *Journal of Small Animal Practice*, 49(1), 4–10.
- Čisovská Bazsalovicsová, E., Králová-Hromadová, I., Štefka, J., Minarik, G., Bokorová, S., Pybus, M. (2015). Genetic interrelationships of North American populations of giant liver fluke *Fascioloides magna*. *Parasites & Vectors*, 8, 288-303.
- Cook, R. M., Suttner, B., Giglio, R. M., Haines, M. L., Latch, E. K. (2022). Selection and demography drive range-wide patterns of MHC-DRB variation in mule deer. *BMC Ecology and Evolution*, 22(1), 42.
- Costantino, P. R., Zeck, S. C., da Silva, W. A., Bicalho, M. da G. (2017). Human leukocyte antigen allele linkage disequilibrium and haplotype structure in volunteer bone marrow donors of Paraná State. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 39(3), 229–236.
- Crofton, H. D. (1971). A model of host-parasite relationships. *Parasitology*, 63(3), 343–364.
- Čurlík, J., Konjević, D., Bujanić, M., Sabol, Ž., Martinković, F., Sindičić, M. (2019). The first description of *Setaria tundra* (Issaitshikoff & Rajewskaya 1928) in roe deer from Croatia. *Helminthologia*, 56(3), 252–255.
- Danilkin, A. (1995). Behavioural ecology of Siberian and European roe deer. Springer. Amsterdam, Netherlands.
- Demiaszkiewicz, A., Kowalczyk, R., Filip - Hutsch, K., Pyziel-Serafin, A. (2018). *Fascioloides magna*: A parasite of roe deer in Bory Zielonogórskie. *Medycyna Weterynaryjna*, 74 (4), 257-264.
- Ditchkoff, S. S., Lochmiller, R. L., Masters, R. E., Hooper, S. R., Van Den Bussche, R. A. (2001). Major-histocompatibility-complex-associated variation in secondary sexual traits of white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*): Evidence for good-genes advertisement. *Evolution; International Journal of Organic Evolution*, 55(3), 616–625.
- Dogiel V. A. (1964). General Parasitology. Oliver & Boyd. Edinburgh, United Kingdom.
- Ebert, D., Fields, P. D. (2020). Host–parasite co-evolution and its genomic signature. *Nature Reviews Genetics*, 21(12), 754-768.



- Edgerly, C. H., Weimer, E. T. (2018). The past, present, and future of HLA Typing in Transplantation. *Methods in Molecular Biology*, 1802, 1–10.
- Eizaguirre, C., Lenz, T. L., Kalbe, M., Milinski, M. (2012). Rapid and adaptive evolution of MHC genes under parasite selection in experimental vertebrate populations. *Nature Communications*, 3(1), 1-6.
- Ellegren, H., Mikko, S., Wallin, K., Andersson, L. (1996). Limited polymorphism at major histocompatibility complex (MHC) loci in the Swedish moose *A. alces*. *Molecular Ecology*, 5(1), 3–9.
- Erhardova-Kotrla, B. (1971). Occurrence of *Fascioloides magna* (Bassi, 1875) in Czechoslovakia. Czech Academy of Sciences. Prague, Czechoslovakia.
- Ewens, W. J. (1972). The sampling theory of selectively neutral alleles. *Theoretical Population Biology*, 3(1), 87–112.
- Excoffier, L., Laval, G., Schneider, S. (2005). Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1, 47–50.
- Excoffier, L., Smouse, P. E., Quattro, J. M. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131(2), 479–491.
- Falk, C. S., Noessner, E., Weiss, E. H., Schendel, D. J. (2002). Retaliation against tumor cells showing aberrant HLA expression using lymphokine activated killer-derived T cells. *Cancer Research*, 62(2), 480–487.
- Filip - Hutsch, K., Pyziel, A. M., Hutsch, T., Bulak, K., Czopowicz, M., Merta, D., Kobielski, J., Demiaszkiewicz, A. (2022). The occurrence of *Fascioloides magna* (Bassi, 1875) in the wild cervid population in the Lower Silesian wilderness - Epidemiological and pathological Aspects. *Journal of Veterinary Research*, 66, 381-387.
- Fernández-de-Mera, I. G., Vicente, J., Pérez de la Lastra, J. M., Mangold, A. J., Naranjo, V., Fierro, Y., De La Fuente, J., Gortázar, C. (2009). Reduced major histocompatibility complex class II polymorphism in a hunter-managed isolated Iberian red deer population. *Journal of Zoology*, 277(2), 157–170.
- Froeschke, G., Sommer, S. (2005). MHC class II DRB variability and parasite load in the striped mouse (*Rhabdomys pumilio*) in the Southern Kalahari. *Molecular Biology and Evolution*, 22(5), 1254–1259.
- Furlong, R. F., Yang, Z. (2008). Diversifying and purifying selection in the peptide binding region of DRB in mammals. *Journal of Molecular Evolution*, 66(4), 384–394.
- Gagnon, M., Yannic, G., Boyer, F., Côté, S. D. (2020). Adult survival in migratory caribou is negatively associated with MHC functional diversity. *Heredity*, 125(5), 290–303.

- Gandon, S., Michalakis, Y. (2002). Local adaptation, evolutionary potential and host–parasite coevolution: Interactions between migration, mutation, population size and generation time. *Journal of Evolutionary Biology*, 15(3), 451–462.
- Gao, F., Chen, C., Arab, D. A., Du, Z., He, Y., Ho, S. Y. W. (2019). EasyCodeML: A visual tool for analysis of selection using CodeML. *Ecology and Evolution*, 9(7), 3891–3898.
- Garrigan, D., Hedrick, P. W. (2003). Perspective - Detecting adaptive molecular polymorphism: lessons from the MHC. *Evolution*, 57(8), 1707–1722.
- Gibbs, M. J., Armstrong, J. S., Gibbs, a J. (2000). Sister-scanning: A Monte Carlo procedure for assessing signals in recombinant sequences. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 16(7), 573–582.
- Gillingham, M. a. F., Courtiol, A., Teixeira, M., Galan, M., Bechet, A., Cezilly, F. (2016). Evidence of gene orthology and trans-species polymorphism, but not of parallel evolution, despite high levels of concerted evolution in the major histocompatibility complex of flamingo species. *Journal of Evolutionary Biology*, 29(2), 438–454.
- Gillingham, M. A. F., Montero, B. K., Wihelm, K., Grudzus, K., Sommer, S., Santos, P. S. C. (2020). A novel workflow to improve genotyping of multigene families in wildlife species: An experimental set-up with a known model system. *Molecular Ecology Resources*, 21(3), 982–998.
- Glenn, T. C. (2011). Field guide to next-generation DNA sequencers. *Molecular Ecology Resources*, 11(5), 759–769.
- Goudet, J. (2001). FSTAT, Version. 1.2: A Computer program to calculate F-statistics. *Heredity*, 86, 485–486.
- Grogan, K. E., McGinnis, G. J., Sauter, M. L., Cuozzo, F. P., Drea, C. M. (2016). Next-generation genotyping of hypervariable loci in many individuals of a non-model species: Technical and theoretical implications. *BMC Genomics*, 17(1), 204.
- Habdija, I., Primc Habdija, B., Radanović, I., Špoljar, M., Matoničkin Kepčija, R., Vujčić Karlo, S., Miliša, M., Ostojić, A., Sertić Perić, M. (2011). Protista-Protozoa i Metazoa-Invertebrata: Strukture i funkcije. Alfa. Zagreb, Croatia.
- Hall, T. (1999). BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95–98.
- Hartl, G., Reimoser, F., Willing, R., Köller, J. (1991). Genetic variability and differentiation in roe deer (*Capreolus capreolus* L.) of Central Europe. *Genetics Selection Evolution*, 23(4), 281–299.
- Heather, J. M., Chain, B. (2016). The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics*, 107(1), 1–8.
- Hedrick, P. W. (1999). Perspective: highly variable loci and their interpretation in evolution and conservation. *Evolution; International Journal of Organic Evolution*, 53(2). 313–318.

- Hedrick, P. W. (2002). Pathogen resistance and genetic variation at MHC loci. *Evolution; International Journal of Organic Evolution*, 56(10), 1902–1908.
- Hedrick, P. W., Lee, R. N., Parker, K. M. (2000). Major histocompatibility complex (MHC) variation in the endangered Mexican wolf and related canids. *Heredity*, 85(6), 617–624.
- Heinrich, S. K., Hofer, H., Courtiol, A., Melzheimer, J., Dehnhard, M., Czirják, G. Á., Wachter, B. (2017). Cheetahs have a stronger constitutive innate immunity than leopards. *Scientific Reports*, 7(1), 44837.
- Hill, A. V. S. (1991). HLA associations with Malaria in Africa: Some implications for MHC evolution. In: Klein, J., Klein, D. (eds) *Molecular Evolution of the Major Histocompatibility Complex*. Springer. Berlin, Germany.
- Hosomichi, K., Shiina, T., Tajima, A., Inoue, I. (2015). The impact of next-generation sequencing technologies on HLA research. *Journal of Human Genetics*, 60(11), 665–673.
- Hughes, A. L., Nei, M. (1988). Pattern of nucleotide substitution at major histocompatibility complex class I loci reveals overdominant selection. *Nature*, 335(6186), 167–170.
- Hughes, A. L., Yeager, M. (1998). Natural selection at major histocompatibility complex loci of vertebrates. *Annual Review of Genetics*, 32, 415–435.
- Hughes, A., Nei, M. (1992). Models of host-parasite interaction and MHC polymorphism. *Genetics*, 132, 863–864.
- Husch, C., Sattmann, H., Hörweg, C., Ursprung, J., Walochnik, J. (2017). Genetic homogeneity of *Fascioloides magna* in Austria. *Veterinary Parasitology*, 243, 75–78.
- Janicki, Z., Slavica, A., Konjević, D., Krešimir, S. (2007). *Zoologija divljači*. Zavod za biologiju, patologiju i uzgoj divljači Veterinarski fakultet. Zagreb, Croatia.
- Jukes, T. H., Cantor, C. R. (1969). Evolution of protein molecules. In: Munro, H. N. (eds) *Mammalian Protein Metabolism*. Academic Press. New York, United States.
- Kashinina, N., Alexey, D., Zvychainaya, E., Kholodova, M., Kiryakulov, V. (2018). On the gene pool of roe deer (*Capreolus*) of Eastern Europe: Analysis of the Cyt b gene sequence variability. *Russian Journal of Genetics*, 54, 825–831.
- Kennedy, L. J., Modrell, A., Groves, P., Wei, Z., Single, R. M., Happ, G. M. (2011). Genetic diversity of the major histocompatibility complex class II in Alaskan caribou herds. *International Journal of Immunogenetics*, 38(2), 109–119.
- Kennedy, L. J., Quarmby, S., Fretwell, N., Martin, A. J., Jones, P. G., Jones, C. A., Ollier, W. E. R. (2005). High-resolution characterization of the canine DLA-DRB1 locus using reference strand-mediated conformational analysis. *Journal of Heredity*, 96(7), 836–842.
- Klasberg, S., Surendranath, V., Lange, V., Schöfl, G. (2019). Bioinformatics Strategies, challenges, and opportunities for next generation sequencing-based HLA Genotyping. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 46(5), 312–324.

- Klein, J., Figueroa, F. (1986). Evolution of the major histocompatibility complex. *Critical Reviews in Immunology*, 6(4), 295–386.
- Klein, J., Sato, A., Nagl, S., O’hUigín, C. (1998). Molecular trans-species polymorphism. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 29(1), 1–21.
- Kloch, A., Baran, K., Buczek, M., Konarzewski, M., Radwan, J. (2013). MHC influences infection with parasites and winter survival in the root vole *Microtus oeconomus*. *Evolutionary Ecology*, 27(3), 635–653.
- Kohn, A. B., Moroz, T. P., Barnes, J. P., Netherton, M., Moroz, L. L. (2013). Single-cell semiconductor sequencing. *Methods in Molecular Biology*, 1048, 247–284.
- Kong, S., Sánchez-Pacheco, S. J., Murphy, R. W. (2016). On the use of median-joining networks in evolutionary biology. *Cladistics*, 32(6), 691–699.
- Konjević, D., Bujanić, M., Erman, V., Gudan Kurilj, A., Živičnjak, T., Severin, K., Tomić, S., Martinković, F. (2017). New data on wild boar (*Sus scrofa* L.) a dead-end host for large American liver fluke (*Fascioloides magna*). *Helminthologia*, 54(1), 77–80.
- Konjević, D., Bujanić, M., Janicki, Z., Slavica, A., Erman, V., Martinković, F., Sindičić, M., Bazsalovicsová, E., Králová-Hromadová, I. (2019). Patološke i epidemiološke značajke invazije metiljem *Fascioloides magna* kod različitih nositelja. *Zbornik radova Veterinarski dani 2019*.
- Kosakovsky Pond, S. L., Frost, S. D. W. (2005). Not so different after all: a comparison of methods for detecting amino acid sites under selection. *Molecular Biology and Evolution*, 22(5), 1208–1222.
- Kosakovsky Pond, S. L., Poon, A. F. Y., Velazquez, R., Weaver, S., Hepler, N. L., Murrell, B., Shank, S. D., Magalis, B. R., Bouvier, D., Nekrutenko, A., Wisotsky, S., Spielman, S. J., Frost, S. D. W., Muse, S. V. (2020). HyPhy 2.5 - A customizable platform for evolutionary hypothesis testing using phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 37(1), 295–299.
- Králová-Hromadová, I., Bazsalovicsová, E., Štefka, J., Špakulová, M., Vávrová, S., Szemes, T., Tkach, V., Trudgett, A., Pybus, M. (2011). Multiple origins of European populations of the giant liver fluke *Fascioloides magna* (Trematoda: Fasciolidae), a liver parasite of ruminants. *International Journal for Parasitology*, 41(3–4), 373–383.
- Králová-Hromadová, I., Juhássová, Ľ., Bazsalovicsová, E. (2016). The giant liver fluke, *Fascioloides magna*: Past, present and future research. Springer. Cham, Switzerland.
- Kumánovics, A., Takada, T., Lindahl, K. F. (2003). Genomic organization of the mammalian Mhc. *Annual Review of Immunology*, 21(1), 629–657.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547–1549.
- Kusak, J., Špi, S., Rajkovi, R., Cvetni, Ž. (2012). Health status of red deer and roe deer in Gorski kotar, Croatia. *Veterinarski Arhiv*, 82(1), 59-73

- Lam, H. M., Ratmann, O., Boni, M. F. (2018). Improved algorithmic complexity for the 3SEQ recombination detection algorithm. *Molecular Biology and Evolution*, 35(1), 247–251.
- Lenz, T. L., Becker, S. (2008). Simple approach to reduce PCR artefact formation leads to reliable genotyping of MHC and other highly polymorphic loci - Implications for evolutionary analysis. *Gene*, 427(1–2), 117–123.
- Lenz, T. L., Wells, K., Pfeiffer, M., Sommer, S. (2009). Diverse MHC IIB allele repertoire increases parasite resistance and body condition in the long-tailed giant rat (*Leopoldamys sabanus*). *BMC Evolutionary Biology*, 9(1), 269.
- Leroy, G., Carroll, E. L., Bruford, M. W., DeWoody, J. A., Strand, A., Waits, L., Wang, J. (2018). Next-generation metrics for monitoring genetic erosion within populations of conservation concern. *Evolutionary Applications*, 11(7), 1066–1083.
- Lewontin, R. C., Kojima, K. (1960). The evolutionary dynamics of complex polymorphisms. *Evolution*, 14(4), 458–472.
- Li, B., Xu, Y., Ma, J. (2013). Allelic characterization of the second DRB locus of major histocompatibility complex class II in Ussuri sika deer (*Cervus nippon hortulorum*): Highlighting the trans-species evolution of DRB alleles within Cervidae. *Animal Cells and Systems*, 17(4), 269–276.
- Librado, P., Rozas, J. (2009). DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25(11), 1451–1452.
- Lighten, J., Van Oosterhout, C., Bentzen, P. (2014). Critical review of NGS analyses for de novo genotyping multigene families. *Molecular Ecology*, 23(16), 3957–3972.
- Liu, T., Chen, C.-Y., Chen-Deng, A., Chen, Y.-L., Wang, J.-Y., Hou, Y.-I., Lin, M. C. (2020). Joining Illumina paired-end reads for classifying phylogenetic marker sequences. *BMC Bioinformatics*, 21(1), 105.
- Lorenzini, R., Lovari, S. (2006). Genetic diversity and phylogeography of the European roe deer: The refuge area theory revisited. *Biological Journal of the Linnean Society*, 88(1), 85–100.
- Lovari, S., Herrero, J., Marco, M., Ambarli, H., Lorenzini, R., Giannatos, G. (2016). *Capreolus capreolus*. *The IUCN Red List of Threatened Species 2016*, eT42395A22161386.
- Magoč, T., Salzberg, S. L. (2011). FLASH: Fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics*, 27(21), 2957–2963.
- Malcicka, M. (2015). Life history and biology of *Fascioloides magna* (Trematoda) and its native and exotic hosts. *Ecology & Evolution*, 5(7), 1381–1397.
- Mardulyn, P. (2012). Trees and/or networks to display intraspecific DNA sequence variation? *Molecular Ecology*, 21(14), 3385–3390.
- Marinculić, A., Džakula, N., Janicki, Z., Hardy, Z., Lučinger, S., Živičnjak, T. (2002). Appearance of American liver fluke (*Fascioloides magna*, Bassi, 1875) in Croatia - A case report. *Veterinarski Arhiv*, 72, 319–325.

- Marmesat, E., Soriano, L., Mazzoni, C. J., Sommer, S., Godoy, J. A. (2016). PCR strategies for complete allele calling in multigene families using high-throughput sequencing approaches. *PLOS ONE*, *11*(6), e0157402.
- Martin, D. P., Lemey, P., Lott, M., Moulton, V., Posada, D., Lefevre, P. (2010). RDP3: A flexible and fast computer program for analyzing recombination. *Bioinformatics*, *26*(19), 2462–2463.
- Martin, D. P., Posada, D., Crandall, K. a, Williamson, C. (2005). A modified bootscan algorithm for automated identification of recombinant sequences and recombination breakpoints. *AIDS Research and Human Retroviruses*, *21*(1), 98–102.
- Martin, D., Rybicki, E. (2000). RDP: detection of recombination amongst aligned sequences. *Bioinformatics*, *16*(6), 562–563.
- Maxam, A. M., Gilbert, W. (1977). A new method for sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *74*(2), 560–564.
- Mikko, S., Anderson, L. (1995). Extensive MHC class II DRB3 diversity in African and European cattle. *Immunogenetics*, *42*(5), 408–413 .
- Mikko, S., Lewin, H. A., Andersson, L. (1997). A phylogenetic analysis of cattle DRB3 alleles with a deletion of codon 65. *Immunogenetics*, *47*(1), 23–29.
- Mikko, S., Røed, K., Schmutz, S., Andersson, L. (1999). Monomorphism and polymorphism at Mhc DRB loci in domestic and wild ruminants. *Immunological Reviews*, *167*, 169–178.
- Miller, K. M., Kaukinen, K. H., Beacham, T. D., Withler, R. E. (2001). Geographic heterogeneity in natural selection on an MHC locus in sockeye salmon. *Genetica*, *111*(1), 237–257.
- Murrell, B., Moola, S., Mabona, A., Weighill, T., Sheward, D., Kosakovsky Pond, S. L., Scheffler, K. (2013). FUBAR: A Fast, Unconstrained Bayesian AppRoximation for inferring selection. *Molecular Biology and Evolution*, *30*(5), 1196–1205.
- Nei, M., Gojobori, T. (1986). Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Molecular Biology and Evolution*, *3*(5), 418–426.
- Nowak, M. A., Tarczy-Hornoch, K., Austyn, J. M. (1992). The optimal number of major histocompatibility complex molecules in an individual. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *89*(22), 10896–10899.
- Ohta, T. (1998). On the pattern of polymorphisms at major histocompatibility complex loci. *Journal of Molecular Evolution*, *46*(6), 633–638.
- Olano, J. P., Weller, P. F., Guerrant, R. L., Walker, D. H. (2011). Principles of Parasitism. *Tropical Infectious Diseases: Principles, Pathogens and Practice*, *1*, 1–7.
- Oomen, R. A., Gillett, R. M., Kyle, C. J. (2013). Comparison of 454 pyrosequencing methods for characterizing the major histocompatibility complex of nonmodel species and the advantages of ultra deep coverage. *Molecular Ecology Resources*, *13*(1), 103–116.

- Padidam, M., Sawyer, S., Fauquet, C. M. (1999). Possible emergence of new geminiviruses by frequent recombination. *Virology*, 265(2), 218–225.
- Pamer, E., Cresswell, P. (1998). Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing. *Annual Review of Immunology*, 16(1), 323–358.
- Paterson, S., Wilson, K., Pemberton, J. M. (1998). Major histocompatibility complex variation associated with juvenile survival and parasite resistance in a large unmanaged ungulate population (*Ovis aries* L.). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(7), 3714–3719.
- Penn, D. J., Potts, W. K. (1999). The evolution of mating preferences and major histocompatibility complex genes. *The American Naturalist*, 153(2), 145–164.
- Pérez-Espona, S., Goodall-Copestake, W. P., Savirina, A., Bobovikova, J., Molina-Rubio, C., Pérez-Barbería, F. J. (2019). First assessment of MHC diversity in wild Scottish red deer populations. *European Journal of Wildlife Research*, 65(2), 1–13.
- Pfeiffer, H. (1983). *Fascioloides magna*: Erster Fund in Osterreich. *Wiener tierärztliche Monatsschrift*, 70, 168-170.
- Phillips, K. P., Cable, J., Mohammed, R. S., Herdegen-Radwan, M., Raubic, J., Przesmycka, K. J., van Oosterhout, C., Radwan, J. (2018). Immunogenetic novelty confers a selective advantage in host–pathogen coevolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(7), 1552–1557.
- Plis, K., Niedziałkowska, M., Borowik, T., Lang, J., Heddergott, M., Tiainen, J., Bunevich, A., Šprem, N., Paule, L., Danilkin, A., Kholodova, M., Zvychnaynaya, E., Kashinina, N., Pokorny, B., Flajšman, K., Paulauskas, A., Djan, M., Ristić, Z., Novák, L., Jędrzejewska, B. (2022). Pan-European phylogeography of the European roe deer (*Capreolus capreolus*). *Ecology and Evolution*, 12(5), e8931.
- Posada, D., Crandall, K. A. (2001). Evaluation of methods for detecting recombination from DNA sequences: Computer simulations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(24), 13757–13762.
- Pursglove, S. R., Prestwood, A. K., Ridgeway, T. R., Hayes, F. A. (1977). *Fascioloides magna* infection in white-tailed deer of southeastern United States. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 171(9), 936–938.
- Pybus, M. J. (2001). Parasitic diseases of wild mammals. *Journal of Mammalogy*, 82(4), 1123–1124.
- Quéméré, E., Galan, M., Cosson, J.-F., Klein, F., Aulagnier, S., Gilot-Fromont, E., Merlet, J., Bonhomme, M., Hewison, A. J. M., Charbonnel, N. (2015). Immunogenetic heterogeneity in a widespread ungulate: The European roe deer (*Capreolus capreolus*). *Molecular Ecology*, 24(15), 3873–3887.
- Radwan, J., Babik, W., Kaufman, J., Lenz, T. L., Winternitz, J. (2020). Advances in the evolutionary understanding of MHC polymorphism. *Trends in Genetics*, 36(4), 298–311.

- Radwan, J., Kawalko, A., Wójcik, J. M., Babik, W. (2006). MHC-DRB3 variation in a free-living population of the European bison, *Bison bonasus*. *Molecular Ecology*, 16(3), 531–540.
- Randi, E., Alves, P. C., Carranza, J., Milošević-Zlatanović, S., Sfougaris, A., Mucci, N. (2004). Phylogeography of roe deer (*Capreolus capreolus*) populations: The effects of historical genetic subdivisions and recent nonequilibrium dynamics. *Molecular Ecology*, 13(10), 3071–3083.
- Raymond, M., Rousset, F. (1995). An exact test for population differentiation. *Evolution*, 49(6), 1280–1283.
- Rekdal, S. L., Anmarkrud, J. A., Johnsen, A., Lifjeld, J. T. (2018). Genotyping strategy matters when analyzing hypervariable major histocompatibility complex-Experience from a passerine bird. *Ecology and Evolution*, 8(3), 1680–1692.
- Richter, S. (1959). Parazitska fauna srne (*Capreolus capreolus* L.) u NR Hrvatskoj. *Veterinarski Arhiv*, 29(1/2), 34–45.
- Rothberg, J. M., Hinz, W., Rearick, T. M., Schultz, J., Mileski, W., Davey, M., Leamon, J. H., Johnson, K., Milgrew, M. J., Edwards, M., Hoon, J., Simons, J. F., Marran, D., Myers, J. W., Davidson, J. F., Branting, A., Nobile, J. R., Puc, B. P., Light, D., ... Bustillo, J. (2011). An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature*, 475(7356), 348–352.
- Salipante, S. J., Kawashima, T., Rosenthal, C., Hoogestraat, D. R., Cummings, L. A., Sengupta, D. J., Harkins, T. T., Cookson, B. T., Hoffman, N. G. (2014). Performance comparison of Illumina and Ion Torrent next-generation sequencing platforms for 16S rRNA-based bacterial community profiling. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(24), 7583–7591.
- Sanger, F., Donelson, J. E., Coulson, A. R., Kössel, H., Fischer, D. (1973). Use of DNA polymerase I primed by a synthetic oligonucleotide to determine a nucleotide sequence in phage fl DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 70(4), 1209–1213.
- Sato, A., Figueroa, F., Murray, B., Málaga-Trillo, E., Zaleska-Rutczynska, Z., Sülthmann, H., Toyosawa, S., Wedekind, C., Steck, N., Klein, J. (2000). Nonlinkage of major histocompatibility complex class I and class II loci in bony fishes. *Immunogenetics*, 51(2), 108–116.
- Sebastian, A., Herdegen, M., Migalska, M., Radwan, J. (2016). Amplisas: A web server for multilocus genotyping using next-generation amplicon sequencing data. *Molecular Ecology Resources*, 16(2), 498–510.
- Sepil, I., Lachish, S., Sheldon, B. C. (2013). *Mhc*-linked survival and lifetime reproductive success in a wild population of great tits. *Molecular Ecology*, 22(2), 384–396.
- Sigurdardóttir, S., Borsch, C., Gustafsson, K., Andersson, L. (1991). Cloning and sequence analysis of 14 DRB alleles of the bovine major histocompatibility complex by using the polymerase chain reaction. *Animal Genetics*, 22(3), 199–209.



- Sigurdardóttir, S., Borsch, C., Gustafsson, K., Andersson, L. (1992). Exon encoding the antigen-binding site of MHC class II beta-chains is divided into two subregions with different evolutionary histories. *Journal of Immunology*, 148(3), 968–973.
- Sindičić, M., Bujanić, M., Posavec, E., Blašković, S., Svetličić, I., Martinković, F., Konjević, D. (2022). Comparison of mitochondrial *cox1* gene in *Fascioloides magna* from different host species. *Veterinarski Arhiv*, 92, 617–621.
- Slade, R. W., McCallum, H. I. (1992). Overdominant vs. frequency-dependent selection at MHC loci. *Genetics*, 132(3), 861–864.
- Slatkin, M. (1996). A correction to the exact test based on the Ewens sampling distribution. *Genetical Research*, 68(3), 259–260.
- Slavica, A., Florijančić, T., Janicki, Z., Konjević, D., Severin, K., Marinculić, A., Pintur, K. (2006). Treatment of fascioloidosis (*Fascioloides magna*, Bassi 1875) in free ranging and captive red deer (*Cervus elaphus* L.) at eastern Croatia. *Veterinarski Arhiv*, 76 (Suppl.), 9-18.
- Smith, J. M. (1992). Analyzing the mosaic structure of genes. *Journal of Molecular Evolution*, 34(2), 126–129.
- Sommer, S. (2003). Effects of habitat fragmentation and changes of dispersal behaviour after a recent population decline on the genetic variability of noncoding and coding DNA of a monogamous Malagasy rodent. *Molecular Ecology*, 12(10), 2845–2851.
- Sommer, S. (2005). The importance of immune gene variability (MHC) in evolutionary ecology and conservation. *Frontiers in Zoology*, 2(1), 16.
- Sommer, S., Courtiol, A., Mazzoni, C. J. (2013). MHC genotyping of non-model organisms using next-generation sequencing: A new methodology to deal with artefacts and allelic dropout. *BMC Genomics*, 14(1), 542.
- Spurgin, L. G., Richardson, D. S. (2010). How pathogens drive genetic diversity: MHC, mechanisms and misunderstandings. *Proceedings. Biological Sciences*, 277(1684), 979–988.
- Stiles, C., Bujanić, M., Martinković, F., Zuckermann, I. C., Konjevic, D. (2021). Severe pulmonary fascioloidosis in a wild mouflon (*Ovis Musimon*)-A Case Report. *Helminthologia*, 58, 394–399.
- Strand, T. M., Segelbacher, G., Quintela, M., Xiao, L., Axelsson, T., Höglund, J. (2012). Can balancing selection on MHC loci counteract genetic drift in small fragmented populations of black grouse? *Ecology and Evolution*, 2(2), 341–353.
- Stutz, W. E., Bolnick, D. I. (2014). Stepwise threshold clustering: A new method for genotyping MHC loci using next-generation sequencing technology. *PLOS ONE*, 9(7), e100587.
- Svetličić, I., Konjević, D., Bužan, E., Bujanić, M., Duniš, L., Stipoljev, S., Martinčić, J., Šurina, M., Galov, A. (2022). Performance Comparison of Different Approaches in Genotyping MHC-DRB: The Contrast between Single-Locus and Multi-Locus Species. *Animals*, 12(18), e2452.

- Swales, W. E. (1935). The life cycle of *Fascioloides magna* (Bassi, 1875), the large liver fluke of ruminants, in Canada: With observations on the bionomics of the larval stages and the intermediate hosts, pathology of *Fascioloidiasis magna*, and control measures. *Canadian Journal of Research*, 12(2), 177–215.
- Swarbrick, P. A., Crawford, A. M. (1997). The red deer (*Cervus elaphus*) contains two expressed major histocompatibility complex class II DQB genes. *Animal Genetics*, 28(1), 49–51.
- Swarbrick, P. A., Schwaiger, F. W., Epplen, J. T., Buchan, G. S., Griffin, J. F. T., Crawford, A. M. (1995). Cloning and sequencing of expressed DRB genes of the red deer (*Cervus elaphus*) MHC. *Immunogenetics*, 42(1), 1–9.
- Tajima, F. (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123(3), 585–595.
- Takahata, N., Nei, M. (1990). Allelic genealogy under overdominant and frequency-dependent selection and polymorphism of major histocompatibility complex loci. *Genetics*, 124(4), 967–978.
- Taylor, S. S., Jenkins, D. A., Arcese, P. (2012). Loss of Mhc and neutral variation in peary caribou: Genetic drift is not mitigated by balancing selection or exacerbated by Mhc allele distributions. *PLOS ONE*, 7(5), e36748.
- The MHC sequencing consortium. (1999). Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. *Nature*, 401, 921–923.
- Trowsdale, J., Knight, J. C. (2013). Major histocompatibility complex genomics and human disease. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 14, 301–323.
- Van Den Bussche, R. A., Hooper, S. R., Lochmiller, R. L. (1999). Characterization of Mhc-DRB allelic diversity in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) provides insight into Mhc-DRB allelic evolution within Cervidae. *Immunogenetics*, 49(5), 429–437.
- Van Den Bussche, R. A., Ross, T. G., Hooper, S. R. (2002). Genetic variation at a major histocompatibility locus within and among populations of white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *Journal of Mammalogy*, 83(1), 31–39.
- Vassilakos, D., Natoli, A., Dahlheim, M., Hoelzel, A. R. (2009). Balancing and directional selection at exon-2 of the MHC DQB1 locus among populations of Odontocete cetaceans. *Molecular Biology and Evolution*, 26(3), 681–689.
- Vinkler, M., Albrecht, T. (2009). The question waiting to be asked: Innate immunity receptors in the perspective of zoological research. *Folia Zoologica Praha*, 58, 15–28.
- Wakeland, E. K., Boehme, S., She, J. X., Lu, C. C., McIndoe, R. A., Cheng, I., Ye, Y., Potts, W. K. (1990). Ancestral polymorphisms of MHC class II genes: Divergent allele advantage. *Immunologic Research*, 9(2), 115–122.
- Ward, H. B. (1917). On the structure and classification of North American parasitic worms. *The Journal of Parasitology*, 4(1), 1–12.

- Watterson, G. A. (1978). The homozygosity test of neutrality. *Genetics*, 88(2), 405–417.
- Westerdahl, H., Asghar, M., Hasselquist, D., Bensch, S. (2012). Quantitative disease resistance: To better understand parasite-mediated selection on major histocompatibility complex. *Proceedings. Biological Sciences*, 279(1728), 577–584.
- Wilkes, D. S., Burlingham, W. J. (2004). *Immunobiology of Organ Transplantation*. Springer. New York, USA.
- Wilson, P. J., Grewal, S., Rodgers, A., Rempel, R., Saquet, J., Hristienko, H., Burrows, F., Peterson, R., White, B. N. (2003). Genetic variation and population structure of moose (*Alces alces*) at neutral and functional DNA loci. *Canadian Journal of Zoology*, 81(4), 670-683

## 8. PRILOZI

Tablica P1. Oznake uzoraka, lokacija odstrijela i genotipovi Caca-DRB 138 jedinki obične srne. Uzorci 1-54 pripadaju pozitivnoj skupini, a uzorci 55-138 negativnoj skupini.

	Oznaka uzorka	Županija	Genotip (Caca-DRB)
1	S1BJ	Bjelovarsko-bilogorska	*0201/*0301
2	1	Bjelovarsko-bilogorska	*0201/*0304
3	3	Bjelovarsko-bilogorska	*0301/*0304
4	4	Bjelovarsko-bilogorska	*0301/*0102
5	8	Bjelovarsko-bilogorska	*0301/*0401
6	9	Bjelovarsko-bilogorska	*0302/*0301
7	11	Bjelovarsko-bilogorska	*0302/*0301
8	12	Bjelovarsko-bilogorska	*0303/*0301
9	13	Bjelovarsko-bilogorska	*0302/*0401
10	14	Bjelovarsko-bilogorska	*0302/*0402
11	16	Bjelovarsko-bilogorska	*0301/*0302
12	17	Bjelovarsko-bilogorska	*0301/*0302
13	18	Bjelovarsko-bilogorska	*0302/*0402
14	20	Bjelovarsko-bilogorska	*0301/*0302
15	22	Bjelovarsko-bilogorska	*0301/*0301
16	23	Bjelovarsko-bilogorska	*0302/*0303
17	24	Bjelovarsko-bilogorska	*0301/*0401
18	25	Bjelovarsko-bilogorska	*0302/*0402
19	28	Bjelovarsko-bilogorska	*0301/*0304
20	29	Bjelovarsko-bilogorska	*0301/*0303
21	30	Bjelovarsko-bilogorska	*0301/*0303
22	33	Bjelovarsko-bilogorska	*0301/*0303
23	35	Bjelovarsko-bilogorska	*0401/*0304
24	36	Bjelovarsko-bilogorska	*0301/*0304

25	37	Bjelovarsko-bilogorska	*0301/*0201
26	40	Bjelovarsko-bilogorska	*0303/*0304
27	41	Bjelovarsko-bilogorska	*0301/*0303
28	42	Bjelovarsko-bilogorska	*0301/*0201
29	47	Bjelovarsko-bilogorska	*0102/*0201
30	15	Bjelovarsko-bilogorska	*0301/*0102
31	34	Bjelovarsko-bilogorska	*0301/*0301
32	67	Bjelovarsko-bilogorska	*0301/*0303
33	93	Bjelovarsko-bilogorska	*0401/*0303
34	95	Bjelovarsko-bilogorska	*0301/*0303
35	98	Bjelovarsko-bilogorska	*0301/*0301
36	99	Bjelovarsko-bilogorska	*0301/*0301
37	106	Bjelovarsko-bilogorska	*0301/*0401
38	107	Bjelovarsko-bilogorska	*0301/*0303
39	108	Bjelovarsko-bilogorska	*0301/*0102
40	109	Bjelovarsko-bilogorska	*0301/*0401
41	SO-11	Bjelovarsko-bilogorska	*0301/*0302
42	SO-12	Bjelovarsko-bilogorska	*0303/*0401
43	SO-13	Bjelovarsko-bilogorska	*0302/*0201
44	SO-14	Bjelovarsko-bilogorska	*0301/*0302
45	SO-15	Bjelovarsko-bilogorska	*0301/*0301
46	SO-16	Bjelovarsko-bilogorska	*0301/*0102
47	SO-19	Bjelovarsko-bilogorska	*0301/*0102
48	SO-20	Bjelovarsko-bilogorska	*0303/*0201
49	SO-21	Bjelovarsko-bilogorska	*0303/*0201
50	S2	Bjelovarsko-bilogorska	*0301/*0301
51	S5	Bjelovarsko-bilogorska	*0303/*0301
52	S6	Bjelovarsko-bilogorska	*0301/*0301
53	S7	Bjelovarsko-bilogorska	*0301/*0401
54	S9	Bjelovarsko-bilogorska	*0302/*0401

55	L1	Ličko-Senjska	*0301/*0302
56	L10	Ličko-Senjska	*0301/*0302
57	L12	Ličko-Senjska	*0302/*0302
58	L13	Ličko-Senjska	*0301/*0301
59	L15	Ličko-Senjska	*0301/*0302
60	L17	Ličko-Senjska	*0102/*0102
61	L20	Ličko-Senjska	*0301/*0302
62	L3	Ličko-Senjska	*0301/*0301
63	L8	Ličko-Senjska	*0201/*0401
64	L11	Ličko-Senjska	*0304/*0405
65	L14	Ličko-Senjska	*0102/*0405
66	L18	Ličko-Senjska	*0301/*0405
67	L19	Ličko-Senjska	*0401/*0301
68	L2	Ličko-Senjska	*0402/*0405
69	L5	Ličko-Senjska	*0301/*0401
70	L6	Ličko-Senjska	*0304/*0301
71	L7	Ličko-Senjska	*0301/*0405
72	L16	Ličko-Senjska	*0302/*0402
73	L4	Ličko-Senjska	*0301/*0402
74	L9	Ličko-Senjska	*0302/*0402
75	1SF	Međimurska	*0301/*0302
76	1ST	Međimurska	*0301/*0302
77	1MS	Međimurska	*0201/*0304
78	1SN	Međimurska	*0302/*0102
79	1SS	Međimurska	*0301/*0102
80	K1	Primorsko-goranska	*0302/*0302
81	K11	Primorsko-goranska	*0301/*0302
82	K15	Primorsko-goranska	*0301/*0302
83	K17	Primorsko-goranska	*0301/*0301
84	K18	Primorsko-goranska	*0301/*0302

85	K20	Primorsko-goranska	*0301/*0303
86	K5	Primorsko-goranska	*0301/*0301
87	K10	Primorsko-goranska	*0302/*0102
88	K13	Primorsko-goranska	*0304/*0301
89	K14	Primorsko-goranska	*0304/*0301
90	K19	Primorsko-goranska	*0301/*0201
91	K3	Primorsko-goranska	*0102/*0301
92	K4	Primorsko-goranska	*0302/*0401
93	K6	Primorsko-goranska	*0304/*0303
94	K7	Primorsko-goranska	*0402/*0304
95	K8	Primorsko-goranska	*0401/*0303
96	K9	Primorsko-goranska	*0302/*0102
97	K12	Primorsko-goranska	*0301/*0402
98	K16	Primorsko-goranska	*0302/*0402
99	K2	Primorsko-goranska	*0302/*0402
100	15SC	Zagrebačka	*0302/*0302
101	16SC	Zagrebačka	*0301/*0301
102	17SC	Zagrebačka	*0301/*0301
103	18SC	Zagrebačka	*0301/*0301
104	19SC	Zagrebačka	*0301/*0302
105	1SC	Zagrebačka	*0301/*0301
106	21SC	Zagrebačka	*0301/*0301
107	22SC	Zagrebačka	*0302/*0302
108	3SC	Zagrebačka	*0301/*0301
109	6SC	Zagrebačka	*0302/*0302
110	7SC	Zagrebačka	*0301/*0301
111	8SC	Zagrebačka	*0301/*0302
112	9SC	Zagrebačka	*0301/*0302
113	M11-35	Zagrebačka	*0301/*0303
114	M12-35	Zagrebačka	*0201/*0201

115	M4-65	Zagrebačka	*0301/*0302
116	M6-35	Zagrebačka	*0302/*0302
117	M7-35	Zagrebačka	*0301/*0301
118	M7-75	Zagrebačka	*0302/*0302
119	M8-25	Zagrebačka	*0301/*0301
120	M8-55	Zagrebačka	*0301/*0301
121	M8-75	Zagrebačka	*0302/*0303
122	M9-55	Zagrebačka	*0201/*0201
123	M9-75	Zagrebačka	*0302/*0302
124	12SC	Zagrebačka	*0304/*0301
125	13SC	Zagrebačka	*0401/*0301
126	14SC	Zagrebačka	*0102/*0301
127	1SL	Zagrebačka	*0403/*0102
128	20SC	Zagrebačka	*0304/*0302
129	2SL	Zagrebačka	*0402/*0102
130	3SL	Zagrebačka	*0403/*0102
131	4SC	Zagrebačka	*0302/*0102
132	4SL	Zagrebačka	*0304/*0301
133	5SC	Zagrebačka	*0304/*0301
134	M6-55	Zagrebačka	*0301/*0201
135	M6-65	Zagrebačka	*0302/*0304
136	M6-75	Zagrebačka	*0102/*0301
137	M9-25	Zagrebačka	*0301/*0201
138	M7-15	Zagrebačka	*0303/*0402

---



## 9. ŽIVOTOPIS

Ida Svetličić rođena je 7. prosinca 1991. godine u Zagrebu, gdje je pohađala osnovnu školu i prirodoslovno-matematičku XV. gimnaziju. Nakon gimnazije, 2010. godine upisuje preddiplomski studij Biologije na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Na istom fakultetu 2013. godine upisuje i Diplomski studij Eksperimentalne biologije (modul fiziologija i imunobiologija). Diplomom magistricе eksperimentalne biologije stječe 2016. godine obranom diplomskog rada pod nazivom „Raznolikost gena DQA i DQB skupine II glavnog sustava tkivne podudarnosti u čagljeva (*Canis aureus*)“. Nakon diplome odrađuje tromjesečnu Erasmus stručnu praksu u Leibniz institute for zoo and wildlife research u Berlinu u Njemačkoj. Nakon toga zapošljava se kao pripravnik u edukaciji u Zoološkom vrtu grada Zagreba. Na Zavodu za animalnu fiziologiju Biološkog odsjeka počinje raditi 2017. godine kao stručni suradnik na EU Interreg Si-Hr projektu Čigra te sudjeluje u nastavi kao asistent na kolegijima Metode u imunologiji i Osnove molekularne ekologije. Od 2020. godine zaposlena je na Zavodu za animalnu fiziologiju kao doktorand na projektu Hrvatske zaklade za znanost “Interakcija nositelj-parazit: odnos tri različita tipa nositelja prema invaziji metiljem *Fascioloides magna* (MAGNA)”. Dvomjesečnu Erasmus stručnu praksu 2022. godine provodi na Univerza na Primorskom u Sloveniji, a kraću praksu odrađuje i u GLOBE Institute u Kopenhagenu u Danskoj. Koautor je na devet znanstvenih radova, od kojih je na dva prvi autor, te na 14 kongresnih priopćenja. Sudjelovala je u događanjima koje populariziraju znanost kao primjerice „Noć biologije“ i „Festival znanosti“.